

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktorin: Professor Dr. med. E.-B. Bröcker

Untersuchungen zur Pathogenität von Antikörpern bei der Epidermolysis bullosa acquisita

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Barbara Dotterweich
aus Obernburg

Würzburg, September 2005

Referent: Prof. Dr. med. D. Zillikens

Koreferent: Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Abkürzungsverzeichnis

BP – bullöses Pemphigoid

bp – Basenpaare

BSA – bovines Serumalbumin

cDNS – complementary DNS

DAB – Diaminobenzidin

DEJ – dermo-epidermale Junktionszone

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTT – Dithiothreitol

EBA – Epidermolysis bullosa acquisita

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

HRP – Horse Radish Peroxidase

IF – Immunfluoreszenz

IPTG – Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid

LBM – Luria-Bertani-Medium

NC – nicht-kollagen

NTB – Nitro Blau Tetrazolium

PBS – Phosphat buffered saline

PCR – Polymerasekettenreaktion

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluorid

RNS – Ribonukleinsäure

RT – Raumtemperatur

SDS-PAGE – Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

TBST – Tris buffered saline plus tween

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	S.1
Fragestellung	S.9
Material und Methoden	
Kultivierung muriner Keratinozyten	S.10
RNS-Isolierung aus Kryoschnitten von Maushaut und PAM 212-Zellen	S.10
Herstellung von cDNS mittels reverser Transkription	S.10
Primer-Design und Amplifizierung der Fragmente mCOL7 A,B und C	S.11
Restriktionsverdau der mittels PCR-amplifizierten cDNS-Fragmente	S.12
Ligation von DNS-Produkten	S.12
Herstellung kompetenter Zellen	S.13
Transformation der kompetenten <i>E. coli</i>	S.13
Screening rekombinanter Klone	S.13
Expression und Präparation der GST-Fusionsproteine	S.14
Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine	S.17
Immunisierung von Kaninchen	S.18
Affinitätsaufreinigung der IgG-Antikörper	S.18
Immunfluoreszenzmikroskopie	S.19
Bestimmung der Komplement-Bindungs-Aktivität	S.19
Gefrierschnittmodell	S.20
Charakterisierung der Kaninchenserum	S.21
Passiver Transfer der IgG-Antikörper in Mäuse und deren Evaluierung	S.21
Statistik	S.21
Ergebnisse	
Isolierung von Typ VII Kollagen cDNS aus murinen Keratinozyten	S.22
Herstellung rekombinanter Plasmide	S.22
Expression rekombinanter Proteine	S.23
Aufreinigung der Fusionsproteine	S.23
Charakterisierung der Kaninchen-Antikörper gegen Typ VII Kollagen	S.25

Mit IgG aus Kaninchenimmunserum injizierte Mäuse entwickeln Blasen an der Haut	S.29
Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie	S.31
Histologie und Elektronenmikroskopie	S.32
In erkrankten Mäusen korreliert das Ausmaß der Hautläsionen mit den Serumspiegeln zirkulierender Serumantikörper gegen Typ VII Kollagen	S.33
5. Diskussion	S.36
6. Schlussfolgerung	S.42
7. Zusammenfassung	S.43
8. Literaturverzeichnis	S.44

Einleitung

Bullöse Autoimmundermatosen sind eine Gruppe organspezifischer Autoimmunerkrankungen, die durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut gekennzeichnet sind. Diese Proteine sind wichtig für den Zell-Zell-Kontakt der Keratinozyten zueinander bzw. für die Adhäsion der Epidermis auf der darunterliegenden Dermis. Die Adhäsion zwischen Epithelzellen wird durch Verankerungskontakte vermittelt, die über Aktin- oder Intermediärfilamente mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden sind. Besonders viele Verankerungskontakte finden sich in Geweben, die einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wie der Epidermis. Verankerungskontakte, die mit Intermediärfilamenten des Zytoskeletts (z. B. Keratinfilamenten) assoziiert sind, werden als Desmosomen und Hemidesmosomen bezeichnet. Während die Hemidesmosomen Epithelzellen auf der Basalmembran verankern, verbinden die Desmosomen zwei Epithelzellen miteinander. Desmosomen sind aus zwei Anteilen aufgebaut, den intrazellulär gelegenen Proteinen der desmosomalen Plaques und den transmembranösen Ca^{++} -abhängigen Cadherinen. Zu den in Keratinozyten exprimierten Cadherinen gehören die Desmogleine und Desmocolline. Durch homophile Bindung der Ektodomänen zweier gleicher Cadherine treten benachbarte Keratinozyten miteinander in Kontakt. Mit dem intrazellulären Anteil binden die Cadherine an Proteine der desmosomalen Plaques. Neben Cadherinen wurden auch verschiedene Plaqueproteine als Zielantigene von Autoimmundermatosen beschrieben.

Die **dermo-epidermale Junktionszone** (DEJ) stellt ein Netzwerk miteinander interagierender Strukturproteine, die das Zytoskelett der basalen Keratinozyten mit Verankerungsfibrillen der papillären Dermis verbinden. Ultrastrukturell lässt sich innerhalb der DEJ die Lamina lucida, die Lamina densa und die Sublamina densa voneinander abgrenzen. Die Zellstruktur des basalen Keratinozyten wird durch ein Geflecht von Keratinfilamenten aufrechterhalten, die an der Membran des Zellkerns sowie an den desmosomalen und hemidesmosomalen Plaques inserieren. Hemidesmosomale Plaques sind elektronendichte, scheibenförmige Strukturen, die am dermalen Pol des basalen Keratinozyten lokalisiert sind. Die Proteine der hemidesmosomalen Plaques bestehen aus mehreren intrazellulären (BP230, Plektin) und transmembranösen Proteinen (BP180, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin), die eine Verbindung der

Zytokeratinfilamente mit Verankerungsfilamenten vermitteln. Die Verankerungsfilamente, die wahrscheinlich aus extrazellulären Anteilen von BP180 und $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, sowie aus weiteren extrazellulären Proteinen wie Laminin 5, bestehen, überkreuzen die Lamina lucida und binden an die Verankerungsfibrillen der Lamina densa und Sublamina densa. Die Verankerungsfibrillen verbinden die Verankerungsfilamente mit den Kollagenfasern der papillären Dermis. Der Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen ist das Typ VII Kollagen (Sitaru *et al*, 2004).

Bei den blasenbildenden Autoimmunkrankheiten unterscheidet man die Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen, die Epidermolysis bullosa acquisita und die Dermatitis herpetiformis Duhring. Bei den Pemphiguserkrankungen ist die Autoimmunantwort gegen desmosomale Proteine gerichtet und die Blasenbildung erfolgt intraepidermal. Bei den übrigen bullösen Autoimmundermatosen werden diverse Proteine der Hemidesmosomen, der Verankerungsfibrillen und –filamente erkannt, was zu einer subepidermalen Blasenbildung führt. Die Ätiologie der Autoimmunantwort ist bei bullösen Autoimmundermatosen unklar. Hinsichtlich der Pathogenese haben sich jedoch vor allem durch molekularbiologische Techniken zahlreiche neue Erkenntnisse ergeben. Die pathogenetische Relevanz der Autoantikörper wurde bei Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen, jedoch nicht bei EBA und Dermatitis herpetiformis Duhring, im passiven Tiermodell demonstriert (Sitaru *et al*, 2004).

Als Zielantigene bei Patienten mit Pemphigus wurden die Desmogleine 1 und 3 (Stanley *et al*, 1982; Amagai *et al*, 1991; Karpati *et al*, 1993; Wang *et al*, 1997), Desmocollin (Hashimoto *et al*, 1997), Plakoglobin (ein intrazelluläres Protein aus der Familie der Plektine) (Korman *et al*, 1989) und Acetylcholinrezeptoren (Nguyen *et al*, 2000a; Nguyen *et al* 2000b) charakterisiert.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden Anstrengungen unternommen, auch die Antigene bei Patienten mit verschiedenen Formen subepidermal blasenbildender Autoimmunerkrankungen zu identifizieren (Abb. 1). Es konnte gezeigt werden, dass die Autoantikörper bei Pemphigoiderkrankungen am häufigsten BP230 (Stanley *et al*, 1981), BP180 (Diaz *et al*, 1990; Giudice *et al*, 1992), Plektin (Laffitte *et al*, 2001), diverse Untereinheiten von Laminin 5 (Domloge-Hultsch *et al*, 1992; Kirtschig *et al*,

1995; Ghohestani *et al*, 2000b; Nousari *et al*, 1999) und $\alpha_6\beta_4$ -Integrin (Bhol *et al*, 2001; Tyagi *et al*, 1996; Bhol *et al*, 2000; Kumari *et al*, 2001) erkennen. Ein 168-170 kDa schweres muköses Antigen (Ghohestani *et al*, 1996), ein 200 kDa schweres dermales Autoantigen (Zillikens *et al*, 1996), Typ IV Kollagen (Ghohestani *et al*, 2000) sowie ein 105 kDa schweres Antigen der Lamina lucida (Chen *et al*, 2001) stellen weitere seltene Zielantigene dieser Erkrankungsgruppe dar. Das Typ VII Kollagen wurde als Zielantigen der EBA identifiziert (Woodley *et al*, 1984 Woodley *et al*, 1988).

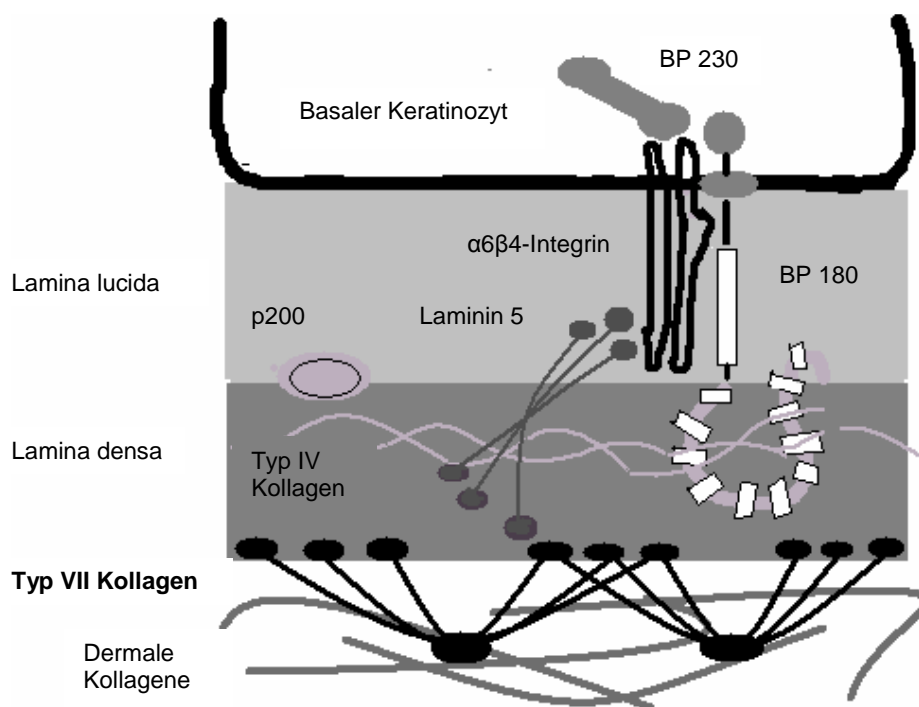


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Autoantigene der dermo-epidermalen Junctionszone. Plektin und BP230 sind intrazelluläre hemidesmosomale Proteine. BP230 interagiert mit BP180 und $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, die transmembranösen hemidesmosomalen Komponenten entsprechen. Die α_6 -Kette von $\alpha_6\beta_4$ -Integrin interagiert extrazellulär mit BP180. $\alpha_6\beta_4$ -Integrin ist Ligand des tiefer in der Lamina lucida und Lamina densa gelegenen Laminin 5. P200 liegt in der unteren Lamina lucida und wurde bisher nicht vollständig als Antigen charakterisiert. Neben anderen ubiquitären Proteinen wie Perlecan und Nidogen (nicht abgebildet) bilden Laminin 5 und Typ IV Kollagen ein Netzwerk in der Lamina densa. Laminin 5 bindet an Typ VII Kollagen, den Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen.

Die EBA ist eine seltene, chronisch verlaufende Erkrankung der Haut und Schleimhäute, die durch subepidermale Blasen sowie gewebegebundene und zirkulierende Autoantikörper gegen die DEJ gekennzeichnet ist. Sie ist eine klinisch heterogene Erkrankung und die Patienten können entzündliche oder nichtentzündliche Phänotypen aufweisen. Die ersten Fälle blasenbildender Erkrankungen mit Beginn im Erwachsenenalter, deren Merkmale an die Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica erinnern, wurden vor mehr als 100 Jahren von Elliot beschrieben (Elliot 1895). Die mechanobullöse, nichtentzündliche Form der EBA wurde 1971 definiert und geht charakteristischerweise mit einer extremen Brüchigkeit der Haut sowie traumatisch induzierten Blasen und Erosionen bevorzugt an den Streckseiten der Extremitäten einher. Diese heilen charakteristischerweise mit Narben- und Milienbildung ab (Roenigk *et al*, 1971). Neben der mechanobullösen Variante wurden einige entzündliche Subtypen der EBA beschrieben, die klinisch das bullöse Pemphigoid, die lineare IgA-Dermatose oder das Schleimhautpemphigoid nachahmen können (Dahl 1979; Gammon *et al*, 1982a; Gammon *et al*, 1984b). Nicht selten entwickeln Patienten, die am Beginn der Erkrankung einen entzündlichen Phänotyp aufweisen, überlappend oder im späteren Verlauf auch mechanobullöse Merkmale (Gammon *et al*, 1984b, Stewart *et al*, 1991). Die EBA ist hauptsächlich eine Erkrankung des Erwachsenenalters, kann jedoch auch bei Jugendlichen auftreten (McCuaig *et al*, 1989; Bernard *et al*, 1995; Lacour *et al*, 1995; Callot-Mellot *et al*, 1997; Caux *et al*, 1997; Park *et al*, 1997; Schmidt *et al*, 2002). Die Erkrankung ist selten; durchschnittlich entfallen etwa 5% aller Patienten, die Antikörper gegen die Basalmembran aufweisen, auf die EBA (Zhu *et al*, 1990).

Immunpathologisch ist die EBA durch in der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbare Ablagerungen von IgG und C3 an der DEJ charakterisiert. In der direkten Immunelektronenmikroskopie sind diese im Bereich von Lamina densa und Sublamina densa der DEJ lokalisiert (Yaoita *et al*, 1981). Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt, dass die im Serum von EBA-Patienten zirkulierenden Autoantikörper an die dermale Seite NaCl-separierter humaner Spalthaut binden (Gammon *et al*, 1984a). In der indirekten Immunelektronenmikroskopie wird die Sublamina densa von den Autoantikörpern erkannt (Woodley *et al*, 1984). Obwohl die Antikörperablagerungen immer die Region der Lamina densa/Sublamina densa betreffen, ist bei manchen EBA-Patienten die

Spaltebene in der Lamina lucida der DEJ lokalisiert (Fine *et al*, 1989). Die Autoantikörper der EBA-Seren erkennen das 290 kDa schwere Typ VII Kollagen im Immunoblot mit Extrakten humaner Dermis (Woodley *et al*, 1984) und präzipitieren dieses Protein aus Extrakten humaner Keratinozyten und Fibroblasten (Stanley *et al*, 1985).

Typ VII Kollagen, das anfangs aus chorioamniotischen Membranen isoliert wurde, ist ein antiparalleles Dimer und stellt den Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen dar (Bentz *et al*, 1983; Morris *et al*, 1986; Sakai *et al*, 1986; Keene *et al*, 1987). Das Gen COL7A1, welches das humane Typ VII Kollagen kodiert, wurde dem kurzen Arm des Chromosoms 3 zugeordnet (Parente *et al*, 1991; Greenspan *et al*, 1993). Das COL7A1 Gen besteht aus 118 Exons, mehr als jedes zuvor beschriebene Gen (Christiano *et al*, 1994a). Typ VII Kollagen ist aus drei identischen α -Ketten zusammengesetzt. Jede dieser Ketten besteht aus einer zentralen, kollagenen 145 kDa schweren Triple-Helix, die aminoterminal von einer 145 kDa nichtkollagenen Domäne (NC1) und carboxyterminal von einer kleineren, 34 kDa nichtkollagenen Domäne (NC2) flankiert wird (Parente *et al*, 1991) (Abb. 2). Im Extrazellulärraum bilden Typ VII Kollagen-Moleküle antiparallele End-zu-End-Dimere, die durch Disulfidbrücken zwischen kleinen Überlappungen auf der carboxyterminalen Seite stabilisiert werden. Ein Fragment der NC2-Domäne wird hierbei proteolytisch abgespalten (Bruckner-Tuderman *et al*, 1995; Chen *et al*, 2001). Die Autoantikörper einer Mehrzahl der EBA-Seren erkennen Epitope innerhalb der NC1-Domäne des Typ VII Kollagens. In seltenen Fällen wird allerdings auch die kollagene oder die NC2-Domäne erkannt (Woodley *et al*, 1988; Gammon *et al*, 1993; Lapiere *et al*, 1993; Tanaka *et al*, 1994; Chen *et al*, 2001; Schmidt *et al*, 2002).

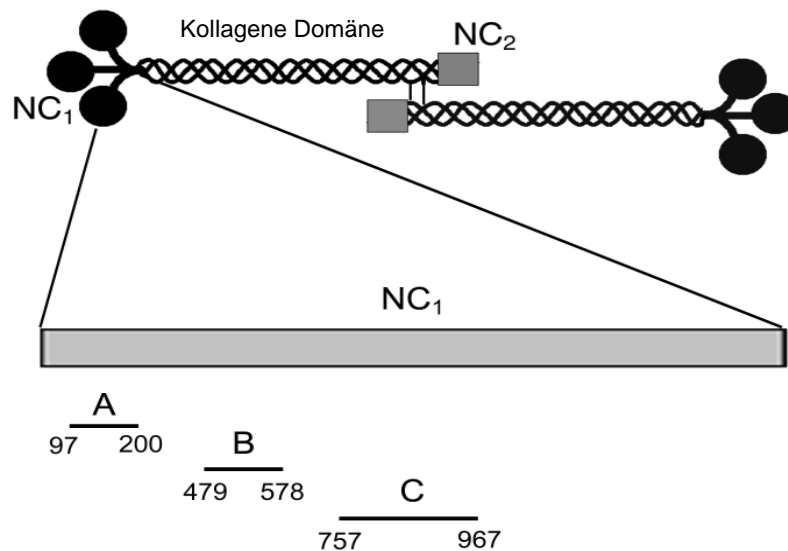


Abbildung 2. Darstellung von Typ VII Kollagen und der für diese Studie generierten cDNS-Fragmente der NC1-Domäne. Typ VII Kollagen ist aus drei identischen α -Ketten zusammengesetzt; schematische Darstellung einer α -Kette, wobei jede aus einer zentralen kollagenen 145 kDa schweren Triple-Helix besteht, deren aminoterminalen Seite von einer 145 kDa nichtkollagenen Domäne (NC1) und deren carboxyterminale Seite von einer kleineren, 34 kDa schweren nichtkollagenen Domäne (NC2) flankiert wird. Typ VII Kollagen Moleküle bilden antiparallele End-zu-End-Dimere, die durch Disulfidbrücken zwischen kleinen Überlappungen an der carboxyterminalen Seite (NC2) stabilisiert werden, während ein Fragment der NC2 Domäne proteolytisch abgespalten wird. Dargestellt sind die drei rekombinanten cDNS-Fragmente mit Angabe der Lokalisation der N- und C-terminalen Aminosäure.

Die biologische Bedeutung von Typ VII Kollagen wird ferner durch die Existenz der Epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) bekräftigt. EBD ist eine Gruppe hereditärer blasenbildender Dermatosen, die durch genetische Defekte in der korrekten Synthese, Sekretion oder molekularen Anordnung von Typ VII Kollagen hervorgerufen wird (Leigh *et al*, 1988; Bruckner-Tuderman *et al*, 1989; Bruckner-Tuderman *et al*, 1990; Smith und Sybert 1990; Christiano *et al*, 1993; Christiano *et al*, 1994b; Hovnanian *et al*, 1997). Darüber hinaus wurde bei Patienten mit systemischer Sklerose in der Dermis unter der regulatorischen Wirkung des Transforming Growth Factor β (TGF- β) eine erhöhte und topographisch atypische Expression von Typ VII Kollagen gefunden. Die Gegenwart von Typ VII Kollagen in der Dermis trägt möglicherweise zu der straffen und indurierten Erscheinung der betroffenen Haut dieser Patienten bei (Rudnicka *et al*, 1994).

Die EBA zählt zu den antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen. Es wird angenommen, dass EBA-Autoantikörper mit der Interaktion von Typ VII Kollagen und Fibronectin interferieren oder die antiparallele Formation der Dimere beeinträchtigen (Woodley *et al*, 1987; Chen *et al*, 2001). Zusätzlich wird als Pathomechanismus eine durch Immunkomplexe vermittelte Entzündung diskutiert, zu der Komplement- und Leukozytenaktivierung beitragen könnten (Gammon *et al*, 1984c; Gammon *et al*, 1989; Mooney *et al*, 1992). *In situ* besteht eine funktionelle Heterogenität gebundener sowie zirkulierender Autoantikörper bezüglich ihrer komplementbindenden Eigenschaften und ihres Vermögens, eine Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zu induzieren (Gammon und Briggaman, 1987). Es wurde gezeigt, dass die Subklassenverteilung polyklonaler EBA-Autoantikörper weder mit ihren komplementbindenden Eigenschaften (Mooney und Gammon, 1990; Bernard *et al*, 1991; Cho *et al*, 1998) noch mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert (Gandhi *et al*, 2000).

Um der Frage nachzugehen, ob Patientenantikörper gegen das Typ VII Kollagen Blasenbildung induzieren können, wurde kürzlich ein Modell verwendet, bei dem Gefrierschnitte normaler humaner Haut zunächst mit Seren von EBA-Patienten und anschließend mit Leukozyten gesunder Spender inkubiert wurden. Hierdurch gelang eine Induktion subepidermaler Spaltbildung, die bei Inkubation der Gefrierschnitte mit Serum gesunder Kontrollen nicht zu beobachten war (Sitaru *et al*, 2002). Die affinitätschromatographisch aufgereinigten IgG-Antikörper gegen die NC1-Domäne des Typ VII Kollagens induzierten ebenfalls eine subepidermale Spaltbildung in diesem Modell, während die restlichen Bestandteile der Patientenserum (Durchlaufraktion) zu keinen pathologischen Veränderungen führten. Diese Untersuchungen zeigten erstmals, dass Patientenautoantikörper gegen Typ VII Kollagen subepidermale Blasen erzeugen können und dass der Immunreaktion gegen die immundominante NC1-Region hierbei eine besondere Bedeutung zukommt. Weitere Untersuchungen dokumentierten, dass die spezifische Inhibition von leukozytärer Elastase und Gelatinase B/MMP-9 zur Inhibition der autoantikörpervermittelten Blasenbildung in diesem Modell führte (Shimanovich *et al*, 2004).

Bei Pemphiguserkrankungen konnte das blaseninduzierende Potenzial der Patientenautoantikörper mittels direktem passiven Transfer in neonatale BALB/c Mäuse bewiesen werden (Anhalt *et al*, 1982). Im Gegensatz dazu zeigten die Autoantikörper von Patienten mit bullösem Pemphigoid keine Kreuzreaktivität mit muriner Haut und vermochten keine Blasenbildung nach passivem Transfer in neonatale Mäuse zu induzieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Kaninchen mit rekombinantem murinem BP180 immunisiert und das Kaninchen-IgG in Mäuse injiziert. Dies resultierte in einer blasenbildenden Erkrankung der Tiere, die alle wichtigen Merkmale des bullösen Pemphigoids imitierte (Liu *et al*, 1993).

Versuche, eine subepidermale Blasenbildung mittels passiven Transfers der Autoantikörper von EBA-Patienten in neonatale BALB/c Mäuse zu induzieren, blieben bisher erfolglos (Shigemoto *et al*, 1988; Borradori *et al*, 1995). Dies ist möglicherweise auf eine zu kurze Interaktionszeit zwischen Antikörper und Antigen oder die unzureichende Sequenzhomologie zwischen menschlichem und murinem Typ VII Kollagen zurückzuführen. Im Vergleich zeigt die cDNS des murinen und humanen Typ VII Kollagen eine Übereinstimmung der Sequenzen von 82,5% (Li *et al*, 1993). In der vorliegenden Arbeit verfolgen wir eine ähnliche Strategie wie zuvor für das bullöse Pemphigoid beschrieben und zeigen zum ersten Mal, dass ein passiver Transfer von Kaninchenantikörpern gegen das murine Typ VII Kollagen zur Reproduktion aller wichtigen klinischen, histologischen und immunpathologischen Merkmalen der EBA in den Tieren führt.

Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein passives Tiermodell für die EBA zu entwickeln und mit dessen Hilfe die pathogenetische Relevanz der Typ VII Kollagen-spezifischen Autoantikörper bei dieser Erkrankung zu belegen. Zu diesem Zweck wurden zunächst rekombinante Fragmente des murinen Typ VII Kollagens hergestellt und zwei Kaninchen damit immunisiert. Die IgG-Antikörper aus den Kaninchenserum wurden aufgereinigt, charakterisiert und in Mäuse injiziert. Die pathogenetischen Merkmale der erzeugten Mauserkrankung wurden anschließend mit denjenigen der EBA beim Menschen verglichen.

Material und Methoden

Kultivierung muriner Keratinozyten

PAM 212-Zellen (Yuspa *et al*, 1980) wurden auf Dubecco's modified Eagle Medium (DMEM; CCPro, Neustadt/W.), dem 10% fetales Kälberserum, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle CCPro) zugefügt wurden, kultiviert.

RNS-Isolierung aus Kryoschnitten von Maushaut und PAM 212-Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus PAM 212-Zellen wurde mittels des Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf) durchgeführt. Für die RNS-Präparation wurden ca. 2×10^7 PAM 212-Zellen verwendet. Nach Kultivierung der Zellen in einer T75-Kulturflasche, wurden diese durch Entfernen des Mediums gewonnen und anschließend mit Phosphate buffered saline (PBS) [0,01 M Na_2HPO_4 , 0,001 M NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7,2] gewaschen. Danach wurde PBS abpipettiert und 0,25% Trypsin in PBS zugegeben. Nach dem Ausfällen der Zellen wurde serumhaltiges Medium zur Inaktivierung des Trypsins zugegeben und bei 300xg 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch vorsichtiges Anschlagen gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 600 µl RLT Puffer lysiert und mittels einer 0,9 mm-Nadel homogenisiert. Nach Zugabe von 60 µl 70% Ethanol wurden 700 µl der Probe auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und 15 s bei 8000xg zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule zunächst mit 700 µl RW1 Puffer und dann mit 500 µl RPE Puffer mehrfach gewaschen. Die RNS wurde anschließend mit 50 µl destilliertem Wasser eluiert.

Herstellung von cDNS mittels reverser Transkription

Die reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNS in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Sie wird nach ihrem Produkt, der cDNS (*complementary* DNS) auch als cDNS-Synthese bezeichnet. Als *Templates* kam die aus PAM 212-Zellen isolierte RNS zum Einsatz. Für einen Standardansatz von 12 µl wurde die RNS auf ein Volumen von 12 µl mit sterilem, destilliertem Wasser und 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) aufgefüllt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl des vom Hersteller (Life Technologies Inc.) angegebenen 5fach-Puffers (First Strand Buffer), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 µl 0,1M

Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C folgte der Zusatz von *SuperScript II Reverstranskriptase*. Die cDNS-Synthese wurde bei 42°C für 50 min durchgeführt. Zur Denaturierung des Enzyms wurde bei 70°C für 15 min inkubiert.

Primer-Design und Amplifizierung der Fragmente mCOL7A, B und C

Die Daten für die DNS-Sequenz des murinen Typ VII Kollagens erhielten wir in der GenBank DNS Datenbank (Cambridge, UK), wobei wir die Akzessionsnummer NM_007738 benutzten (Li *et al*, 1993).

Durch speziell konstruierte Primer (MWG Biotech, Ebersberg) für drei Fragmente der NC1-Domäne des Typ VII Kollagens wurden diese Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so konstruiert, dass der Vorwärtsprimer (FP) eine Sequenz enthielt, an der die Restriktionsendonuklease *Bam H I* schneiden konnte. Es folgte eine für die Erkennungsstelle von Faktor Xa kodierende Sequenz, die es bei Bedarf später ermöglichen sollte, das rekombinante GST-Fusionsprotein in das rekombinante NC1-Fragment und GST zu spalten, und schließlich die *Annealing-Sequenz*. Der Rückwärtsprimer (RP) kodierte eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Sal I*, ein Stop-Codon und die *Annealing Sequenz* (Tabelle 1).

Die Reaktion erfolgte in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) in 35 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 30 s Denaturierung bei 96°C, 30 s *Annealing* bei 55°C und 20 s Verlängerung bei 72°C bestand. Nach dem letzten Zyklus folgte eine Phase zur Kettenverlängerung bei 72°C für 5 min.

Tabelle 1. Primer Sequenz für die PCR-Amplifizierung der cDNA Fragmente des Typ VII Kollagens

Fragment	Größe (bp)	Primer Sequenz (5'-3')
mCOL7 A	309	FP: GATC <u>GGATCC</u> ATAGAAGGAAGACTTGGCTCTGGGAGTGACAC <i>Bam HI</i> <i>Faktor Xa</i> RP: GATC <u>GTCGAC</u> TCAATTGACGAAGAAGAAGAAATCG <i>Sal I</i> <i>Stop</i>
mCOL7B	300	FP: GATC <u>GGATCC</u> ATAGAAGGAAGAACTGAGTACCGTCTCACGCTG RP: GATC <u>GTCGAC</u> TCAAGACACCCGCACCGTGTA
mCOL7C	630	FP: GATC <u>GGATCC</u> ATAGAAGGAAGAGTAGCTGGTGTGGATGGAGC RP: GATC <u>GTCGAC</u> TCAGTCCACCACGCGTAGTTCAG

Restriktionsverdau der mittels PCR-amplifizierten cDNS-Fragmente

Die durch PCR amplifizierten Fragmente wurden jeweils mit *Sal I* und *Bam H I* (Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, U.S.A.) verdaut, um den Einbau der Fragmente in den Vektor, hier linearisiertes pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), vorzubereiten. Hierfür wurden 20 µl des Puffers Y+/Tango (Fermentas), 30 µl NC-1-mCOL7A bzw. B bzw. C cDNS, 5 µl *Bam H I*, 5 µl *Sal I* und 40 µl destilliertes Wasser benutzt. Das Gemisch wurde 24 h bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden danach durch Inkubation für 20 min bei 80°C inaktiviert. Die verdauten Fragmente wurden mit einem Microspin SR-400 (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigt, mit 96% Ethanol präzipitiert und in 20 µl destilliertem Wasser resuspendiert.

Ligation von DNS-Produkten

Für einen Standardligationsansatz von 10 µl wurde zum linearisierten Vektor (10-30 ng) das DNS-Fragment im 3-4-fachen molaren Überschuß zugegeben. Dieser Ansatz

wurde auf Eis gestellt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Nach Zusatz von 1 µl des vom Hersteller (Q-BIOgene, Heidelberg) empfohlenen 10fach Ligasepuffers wurde die Ligationsreaktion mit 1 µl T4-DNA-Ligase (2,5 U) gestartet. Die Ligation erfolgte bei 14°C für 4-16 h.

Herstellung kompetenter Zellen

Hitzeschockkompetente Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode von Hanahan *et al* (1983) hergestellt. Bakterienzellen wurden als 100 ml LB-Flüssigkultur [Luria-Betani-Medium (LBM), 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (beide Difco Laboratories, Detroit, USA), 0,17 M NaCl, pH7,5] bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,4) angezogen. Diese wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4°C und 2.500xg für 5 min pelletiert und in 1,25 ml eiskalter MgCl₂-Lösung (Sigma, St. Louis, U.S.A.) resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung [60 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, 10 mM PIPES (Roth, Karlsruhe), pH 6,8] resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Beim letzten Waschen wurden die Zellen in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen, zu Volumina von je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Transformation der kompetenten E. coli

Die als Transformation bezeichnete Aufnahme von Fremd-DNS in Bakterienzellen wurde durch Hitzeschocktransformation erzielt. Dazu wurden 50 µl Hitzeschockkompetente Zellen zusammen mit 1-5 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42°C über 45 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 450 µl des auf 37°C vorgewärmten LBM wurden die Zellen für 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 250 U/min regeneriert. Zur Selektion wurden sie anschließend auf antibiotikahaltige LBM-Agarplatten ausgestrichen.

Screening rekombinanter Klone

Nach Transformation der Bakterien (pGEX-NC1-mCOL7A und pGEX-NC1-mCOL7C in *E. coli* Rosetta blue; pGEX-NC1-mCOL7B in TG1-Zellen) wurden verschiedene Kolonien mittels PCR auf positive Klone gescreent. Hierfür wurde ein Master Mix wie folgt präpariert: 25 µl 10x PCR-Puffer, 10 µl dNTPs (10 mM), 10 µl des jeweiligen Vorwärtsprimers, 10 µl des jeweiligen Rückwärtsprimers, 10 µl Taq Polymerase

(Sigma) und 185 µl destilliertes Wasser. Die PCR erfolgte in 35 Zyklen, jeder bestehend aus 3 min bei 96°C, 30 s bei 96°C, 30 s bei 61°C, 3 min bei 72°C und 5 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt, um die PCR zu beenden. 10 µl der entsprechenden Klone wurden nach PCR im 2% Agarosegel mit 10 µl der jeweils reinen cDNS des entsprechenden Fragments als Positivkontrolle und 10 µl reiner cDNS eines der anderen Fragmente als Negativkontrolle geladen.

Klone, die im Screening positiv waren, wurden mittels *Bam* H I- und *Sal* I-Verdau vor der Proteinexpression nochmals auf die korrekte Insertion der cDNS in den Vektor geprüft. Die verwendeten Reagenzien stammten von Fermentas Life Sciences Inc. Dafür wurden zunächst 10 µl der DNS mit 2 µl *Bam* H I, 2 µl Puffer *Bam* H I und 6 µl H₂O 2 h inkubiert, danach bei 80°C für 15 min die Enzymaktivität gestoppt und mit Ethanol präzipitiert. Nun wurden 16 µl cDNS mit 2 µl *Sal* I und 2 µl Puffer O+ 2 h inkubiert, die Reaktion bei 65°C 15 min inaktiviert und mittels Gelelektrophorese untersucht.

Expression und Präparation der GST-Fusionsproteine

Zur Generation des GST und der GST-Fusionsproteine GST-NC1-mCOLVIIA, B und C benutzten wir das bakterielle Expressionssystem pGEX (Pharmacia, Piscataway, U.S.A.). Die positiven Klone für die jeweiligen Fragmente wurden in 10 ml LBM und 0,05 mg/ml Carbenicillin (Sigma) über Nacht bei 37°C und 220 U/min kultiviert. Die Kulturen wurden 1:1 mit Glycerol verdünnt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C als Stocks aufbewahrt.

Zum Präparieren der Primärkulturen wurden mit sterilen Zahnstochern Bakterien aus den Stocks gepickt und für GST-NC1-mCOLVIIC mit 10 ml LBM und 0,05 mg/ml steril filtriertem Carbenicillin über Nacht bei 37°C und 220 U/min inkubiert. Anschließend wurden diese Primärkulturen im Verhältnis 1:50 mit auf Inkubationstemperatur vorgewärmtem LBM verdünnt und mit 0,05 mg/ml Carbenicillin versetzt. Die Sekundärkulturen wurden bei 220 U/min und 37°C solange inkubiert bis die OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,5 mM zur Hemmung des Bakterienwachstums und Anregung der GST-Fusionsproteinsynthese zugegeben und die Kulturen unter den gleichen Bedingungen über weitere 2 h inkubiert. Danach wurden die Sekundärkulturen auf Eis gestellt und bei 5000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pelletts aus 1 L Kultur nach

wiederholtem Waschen in 6 ml PBS unter Zugabe von 1mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden 3 mal 20 s ultrasonikiert (Sonopuls HD-70, Bandelin, Berlin) und bei 13000 U/min 30 min zentrifugiert. Der Bodensatz wurde verworfen und der Überstand bis zur Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Glutathion-Agarose bei -20°C aufbewahrt.

GST-NC1-mCOLVIIA und B wurden von den *E. coli* als Einschlusskörperchen produziert, weshalb hier zur Hemmung der Proteinexpression während der Kultivierung der *E. coli* 40% Glucose (Merck, Darmstadt) zum Medium gegeben wurde. Zunächst wurden 100 ml Übernachtskultur mit 1 ml 40% Glucose (Merck, Darmstadt) und 100 μl Carbenicillin (Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$) im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 900 ml LB M und 10 ml 40% Glucose sowie 1 ml Carbenicillin zur Übernachtskultur gegeben und weitere 1,5 - 2 h kultiviert, um eine OD_{600} zwischen 0,6 und 0,7 zu erreichen. Dann wurde die Proteinexpression für weitere 2 h bis 3 h mit 1 ml IPTG induziert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gegeben und bei 5000 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, erneut bei 5000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der Einschlusskörperchen wurden folgende Stocklösungen hergestellt: Lysozym 50 mg/ml, DNase 1 mg/ml in 50% Glycerol, 75 mM NaCl, MgCl_2 0,5 M, Tris-Cl 2,5 M pH 8,0, NaEDTA 0,5 M in 50 mM Tris-Cl, pH 8,0, NaAzid 30% in PBS, Na Deoxycholat 10%, Triton X-100 10%, 5 M NaCl und 1 M DTT (alle Sigma). Vor jeder Isolierung und Aufreinigung der in Form von Einschlusskörperchen exprimierten Fusionsproteine wurden die folgenden Puffer entsprechend Tabelle 2 hergestellt.

Tabelle 2: Verwendete Puffer für die Aufreinigung von Einschlußkörperchen

Lösungspuffer (13 ml) pH 8,0	50 mM Tris-Cl 25% Sucrose 1 mM NaEDTA 0,1% NaAzide 10 mM DTT	260 µl stock 3,25 g 26 µl stock 43,3 µl stock 130 µl stock
Lysepuffer (12,5 ml) pH 8,0	50 mM Tris-Cl 1% Triton X-100 1% Na deoxycholate 100 mM NaCl 0,1% NaAzide 10 mM DTT	250 µl stock 1,25 ml stock 1,25 ml stock 250 µl stock 42 µl stock 125 µl stock
Waschpuffer (10 ml) mit Triton pH 8,0	50 mM Tris-Cl 0,5% Triton X-100 100 mM NaCl 1 mM NaEDTA 0,1% NaAzide 1 mM DTT	200 µl stock 0,5 ml stock 200 µl stock 20 µl stock 33,3 µl stock 10 µl stock
Waschpuffer (10 ml) ohne Triton pH 8,0	50 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 1 mM NaEDTA 0,1%NaAzide 1 mM DTT	200 µl stock 200 µl stock 20 µl stock 33,3 µl stock 10 µl stock

Das bei -80°C gelagerte Pellet wurde in 13 ml Lösungspuffer resuspendiert, 30 s auf Eis ultrasonikiert und mit 100 µl Lysozym, 250 µl DNase und 50 µl MgCl_2 versetzt. Nach Inkubation über 30-60 min bei Raumtemperatur wurde 350 µl EDTA zugegeben und die Probe in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach langsamen Auftauen wurden 200 µl MgCl_2 und nach 30 bis 60 min 350 µl EDTA zugegeben. Die nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Lösung wurde bei 5000 U/min und 4°C 20 min zentrifugiert. Der Überstand Ü1 wurde in einem 50 ml Falcon auf Eis aufbewahrt. Das entstandene Pellet wurde mit 10 ml Waschpuffer mit Triton X-100 resuspendiert und 30 s ultrasonikiert. Danach wurde erneut bei 5000 U/min und 4°C 20 min zentrifugiert und der Überstand Ü2 zu Ü1 in den 50 ml Falcon auf Eis gegeben. Das Pellet wurde mit Waschpuffer ohne Triton X-100 resuspendiert, 30 s

sonikiert und bei 5000 U/min und 4°C 20 min zentrifugiert. Der Überstand Ü3 wurde zu Ü1 und Ü2 gegeben. Die Überstände Ü1, Ü2 und Ü3 wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine

Die Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine GST-NC1-mCOLVIIA, GST-NC1-mCOLVIIB und GST-NC1-mCOLVIIC erfolgte mit Hilfe einer Glutathion Agarose Matrix (Sigma). Die initial bei –20°C gelagerte Matrix wurde in 50 ml sterilem destilliertem Wasser resuspendiert und bei 4°C über Nacht gelagert. Danach wurde die Matrix auf die chromatographische Säule (Bio Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.) gegeben und dreimal mit PBS gewaschen. Gleichzeitig wurde eines der bei –20°C gelagerten GST-Fusionsproteine auf Eis aufgetaut.

10 ml des aufgetauten GST-Fusionsproteins GST-NC1-mCOLVIIC wurden auf die Säule gegeben und bei 4°C 1 h auf dem Taumler inkubiert. Die Säule wurde dann mit 30 ml PBS gewaschen, die gebundenen GST-Fusionsproteine mit 15 ml 0,01 M Glutathion (Sigma) in PBS, pH 7,5 eluiert und die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Die GST-Fusionsprotein-haltigen Eluatfraktionen wurden gepoolt, gegen destilliertes Wasser dialysiert (MWCO 10,000 Da; Carl Roth) und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in einer möglichst geringen Menge PBS aufgenommen, mittels der OD₂₈₀ analysiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

SDS-PAGE und Immunoblot

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte an Polyacrylamidgelen, die wie folgt zusammengesetzt wurden. Trenngele: 15% Acrylamid (Biorad), 0,375 M Tris-base, 0,1% SDS (Merck), 0,1% Tetramethylethyldiamin (Sigma), 12 µM Ammoniumpersulfat (Sigma), pH 8,8. Sammelgele: 5% Acrylamid, 0,125 M Tris-base, 0,1% SDS, 0,2% Tetramethylethyldiamin, 24 µM Ammoniumpersulfat, pH 6,8. Um die Trennung der Proteine nach deren spezifischem Gewicht und nicht nach Ladungen zu ermöglichen, wurden die bei –20°C gelagerten GST-Fusionsproteine im Verhältnis 5:1 mit der 5fachen SDS(+)-Lösung [0,3 M Tris-base, 5,9 M Glycerol (Roth, Karlsruhe), 15 mM Bromphenol (Merck), 3,7 M 2-Merkaptoäthanol (Merck), pH 6,8] versetzt. Vor dem Laden in die Geltaschen wurden alle Proteinlösungen bei 100°C 2

min gekocht, um die maximale Entfaltung der Moleküle zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer (25 mM Tris-base, 192 mM Glycin, 1% SDS, pH 8,3) bei 90 mA und Raumtemperatur. Danach wurden die Gele mit Coomassie Blau (Sigma) gefärbt.

Alternativ wurden die Trenngele für den Immunoblot auf Nitrozellulose transferiert und in Transferpuffer [25 mM Tris-base, 192 mM Glycin, 20% Methanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland), pH 8,3] übertragen. Der Transfer erfolgte bei 35 V und 150 mA, 4°C für 4 h.

Die Nitrozellulose wurden über 1 h in 3% Magermilchpulver (Merck) in Tris-buffered saline plus tween Puffer [TBST; 0,02 M Tris-base, 0,15 M NaCl, 0,01% Tween-20 (Sigma), pH 7,5] geblockt und anschließend über 1 h mit einem GST-spezifischen Erstantikörper (SA 8009 1:1000) inkubiert (Sitaru *et al*, 2002b). Nach einem Waschvorgang folgte die Inkubation mit HRP-markiertem Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:1000; DAKO, Glostrup, Dänemark) über 1 h bei RT. Die Entwicklung erfolgte mittels Diaminobenzidin (DAB; Merck).

Immunisierung der Kaninchen

Die Seren von sechs neuseeländischen Weißkaninchen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz bezüglich der Reaktivität zirkulierender IgG-Antikörper gegen humane und murine Haut getestet. Die beiden Kaninchen, deren Seren die geringste unspezifische Reaktivität zeigten (SA 2953 und SA 2954), wurden subkutan mit 200 µg äquimolarer, in komplettem Freundschem Adjuvans resuspendierter Mixtur der drei aufgereinigten GST-Fusionsproteine immunisiert. Anschließend wurden die Kaninchen zweimal im Abstand von 15 Tagen mit der gleichen Proteinpräparation in inkomplettem Freundschem Adjuvans geimpft. Die Immunisierung wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. In Abständen von vier Wochen wurden die Seren SA 2953 und SA 2954 mehrfach entnommen und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf ihre IgG-Reaktivität mit der murinen Basalmembran getestet. Die Kaninchenserum wurden bis zur IgG-Aufreinigung bei – 20°C gelagert.

Affinitätsaufreinigung der Kaninchen-IgG-Antikörper

Das IgG aus den Kaninchenserum wurde mittels Protein G Sepharose Fast Flow Affinitäts-Säulen-Chromatographie (Amersham Biosciences) (Sitaru *et al*, 2002b) gewonnen. Hierbei wurden die Seren der Kaninchen auf die Säulenmatrix gegeben;

die Antikörper wurden mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,5 (Sigma) eluiert und mit Tris-HCl neutralisiert. Das Eluat wurde mit Ultrafree 15 Filtern (Millipore, Billerica, U.S.A.) bei 5000 U/min ca. 20 min aufkonzentriert, bis die Lösung zäh wurde. Das aufgereinigte IgG wurde steril filtriert und die Proteinkonzentration spektralphotometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Reaktivität der IgG-Antikörper wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf Maushaut getestet.

Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurden die Kaninchenserum SA 2953 und SA 2954 mit PBS in den Verhältnissen 1:10240, 1:20480, 1:40960, 1:81920, 1:163840 und 1:327680 verdünnt und mit Gefrierschnitten der Maushaut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde präimmunes Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:80 verwendet. Danach wurden die Gefrierschnitte dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit einem FITC-markierten Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:100; DAKO, Glostrup, Dänemark) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Objektträger mit 50% Glycerol (Roth) eingedeckt und immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie

Aus Biopsien der Hautläsionen und periläsionaler Haut der immunisierten Mäuse wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese mit einem FITC-markierten Ziege anti-Kaninchen-IgG und -C3 (jeweils 1:100; DAKO) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der indirekten Immunfluoreszenz.

Bestimmung der Komplement-Bindungs-Aktivität

Gefrierschnitte muriner und humaner Haut wurden mit Kaninchen-IgG in Verdünnung 1:50 bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS (pH 7,2) 10 min gewaschen. Danach wurden die Gefrierschnitte mit frischem Mausserum als Komplementquelle weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Hierzu wurde Mausserum mit Veronalpuffer [150 mM NaCl, 3 mM 5,5'-diethylbarbitursäure, 1 mM sodium 5,5'-diethylbarbiturat, 0,15 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂; pH 7,4 (alle Sigma)] 1:5 verdünnt eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden C3-Ablagerungen mit einem FITC-markierten Ziege anti-human C3-Antikörper (Kallestad Diagnostics, Austin, U.S.A.) visualisiert (Sitaru *et al*, 2004).

Gefrierschnittmodell

Die Seren der immunisierten Kaninchen und Präimmunseren wurden 30 min bei 56°C inkubiert, um ihre Komplementaktivität zu inaktivieren, und zweifach mit PBS verdünnt. Daneben wurde Kaninchen-IgG mittels Protein G affinitätsaufgereinigt und mit PBS auf einen Titer von 1:80 (indirekte Immunfluoreszenz) verdünnt. Der murine monoklonale Antikörper gegen Typ VII Kollagen (Klon LH 7.2; Sigma) wurde bei einem Titer von 1:1000 verwendet. Die Gefrierschnitte normaler muriner oder humaner Haut wurden mit verdünntem Serum bzw. dem monoklonalen Antikörper beschichtet und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Aus peripherem Blut gesunder Spender wurden mittels eines Sodium Diatrizeat- und Dextran 500-haltigen Sediment-Gradienten-Mediums (Nycomed, Oslo, Norwegen) Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden ausgefällt, zweimal mit RPMI 1640 (Life Technologies) gewaschen und im gleichen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis gegeben und die Zellviabilität mit Trypan Blau (Roth) getestet. Es wurden nur Zellsuspensionen mit einer Viabilität größer als 95% verwendet. Bei Untersuchungen des Aktivierungsstatus der Leukozyten wurden diese in einem 0,5% Nitroblau-Tetrazolium-Medium (NBT; Roth) resuspendiert. Serum gesunder Spender, das als Komplementquelle diente, wurde 2fach mit RPMI verdünnt. Dieses wurde mit den Leukozyten im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Antikörper-behandelten Gefrierschnitte gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurden die Schnitte mit PBS gewaschen, luftgetrocknet, Formalin fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Charakterisierung der Kaninchenserum

Aufgereinigtes GST sowie die GST-Fusionsproteine GST-mCOLVIIA, GST-mCOLVIIB, und GST-mCOLVIIC wurden in gleichen Konzentrationen auf ein 15% Polyacrylamidgel geladen, mittels SDS-PAGE separiert und auf Nitrozellulose transferiert (s.S. 18). Die Kaninchenserum wurden 1:100 in 1% BSA (Sigma) in TBST-Puffer verdünnt und mit aufgereinigtem GST 24 h präabsorbiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden anschließend mittels Zentrifugation (4°C, 14000 U/min, 15 min) entfernt und der Überstand entnommen. Die präadsorbierten Kaninchenserum SA 2953, SA 2954, SA 8009 und präimmunes Serum wurden im Immunoblot mit

GST und den GST-Fusionsproteinen GST-NC1-mCOLVIIA, B und C wie oben beschrieben untersucht (s.S. 18)

Die Kaninchenserum SA 2953, SA 2954 und präimmunes Serum wurden zusätzlich mittels Immunoblot mit dermalen Extrakten muriner Dermis untersucht, um die Reaktivität der generierten Antikörper mit nativem murinem Typ VII Kollagen zu prüfen (Shimanovich *et al* , 2003).

Passiver Transfer der IgG-Antikörper in Mäuse und deren Evaluierung

Aufgereinigtes Kaninchen-IgG gegen murines Typ VII Kollagen oder normales Kaninchen-IgG wurde in einer Konzentration von 15 mg/ml subkutan sechsmal jeden zweiten Tag in den Rücken der BALB/c^{nu/nu} Mäuse (Charles River, Sulzfeld) injiziert. Täglich wurden die Mäuse gewogen, auf ihren Allgemeinzustand und auf kutane Läsionen, wie Erythem, Blasen, Erosionen und Krusten untersucht. Intakte Blasen oder Erosionen wurden gezählt und das Ausmaß der Hauterkrankung folgendermaßen gewertet. 0: keine Läsionen; 1: < 20 Läsionen oder < 10% der Hautoberfläche; 2: > 20 Läsionen oder 10-20% der Hautoberfläche; 3: 20-40% der Hautoberfläche; 4: 40-60% der Hautoberfläche; 5: > 60% der Hautoberfläche.

Um die Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Antikörpertiter zu bestimmen, wurde vor Injektion der Antikörper sowie 4, 8 und 12 Tage danach Mausserum entnommen und mittels indirekter Immunfluoreszenz auf normaler Maushaut austitriert.

Zwei Tage nach der letzten Injektion wurden läsionale und periläsionale Biopsien der Haut, des Ösophagus und des Kolons entnommen und in 4% Formalin fixiert. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Biopsien in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Statistik

Die Korrelation zwischen den Titern der indirekten Immunfluoreszenz und der Krankheitsaktivität wurde mittels des Spearman´s Rank Korrelationstestes untersucht (Sitaru *et al*, 2004).

Ergebnisse

Isolierung von Typ VII Kollagen cDNS aus murinen Keratinozyten

RNS konnte erfolgreich aus Kryoschnitten von Maushaut und aus PAM 212-Zellen gewonnen werden, aus der wiederum mittels reverser Transkription cDNS hergestellt wurde. Danach erfolgte die Amplifizierung (Abb. 3) der cDNS mittels PCR unter Verwendung spezieller Primer, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam* H I und *Sal* I enthielten.

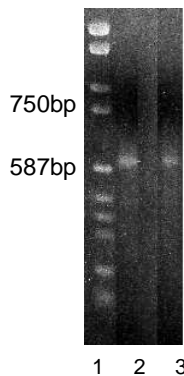


Abbildung 3. Darstellung der mittels PCR amplifizierten NC1-cDNS in der Gelelektrophorese. Die aus PAM 212-Zellen (*Spur 2*) isolierte RNS wurde mittels reverser Transkription in NC1-cDNS umgewandelt und zeigt die gleiche Anzahl an Basenpaaren (630bp) wie die aus Gefrierschnitten von Maushaut gewonnene NC1-cDNS (*Spur 3*). In *Spur 1* wurde DNS-Marker III geladen.

Herstellung rekombinanter Plasmide

Vor der Ligation der amplifizierten cDNS-Fragmente und des Vektors pGEX-6P-1 wurden diese mit *Bam* H I und *Sal* I verdaut und die cDNS-Fragmente A, B und C wurden mittels PCR auf die korrekte Anzahl der errechneten Basenpaare gescreent. Erwartungsgemäß migrierten die Fragmente entsprechend ihrer berechneten Größe: Fragment A 309bp, Fragment B 300bp und Fragment C 630bp (Abb. 4). Nach Ligation erfolgte die Transformation von pGEX-NC1-mCOL7A, B und C in *E. coli*. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht klar, mit welchen *E. coli* die jeweiligen Fusionsproteine am besten exprimiert werden konnten, so dass für alle Fragmente zunächst TG-1-, *Rosetta blue*- und auch BL21-Zellen verwendet wurden.



Abbildung 4. PCR-Screening der amplifizierten mCOL7-Fragmente am Beispiel von mCOL7C-cDNS. Nach Umwandlung der aus PAM 212-Zellen gewonnenen RNS in cDNS mittels reverser Transkription wurde das Fragment C unter Verwendung eines speziellen Primers amplifiziert, mit *Bam* H I und *Sal* I verdaut und im Agarosegel geladen (*Spuren 2-8*). Fragment C stellt sich entsprechend der errechneten Größe von 630bp dar. In *Spur 1* wurde DNS-Marker VI geladen.

Expression rekombinanter Proteine

Nach erfolgreichem Nachweis des vollständig transformierten Vektors in *E. coli* mittels Verdau mit *Bam* H I und *Sal* I (Abb. 5), testeten wir im SDS-PAGE 10 ml Übernachtskulturen der verschiedenen *E. coli*-Stämme nach Induktion mit IPTG auf Proteinexpression. Für GST-NC1-mCOLVIIC eignete sich am besten ein Klon des Rosetta blue-Stammes. Für GST-NC1-mCOLVIIA zeigte ebenfalls ein Rosetta blue-Stamm die besten Eigenschaften, für GST-NC1-mCOLVIIB wurden TG1-Zellen benutzt. Im 15% Polyacrylamidgel migrierten die GST-Fusionsproteine entsprechend des berechneten Molekulargewichts: GST-NC1-mCOLVIIA 38,8 kDa, GST-NC1-mCOLVIIB 38,2 kDa und GST-NC1-mCOLVIIC 49,5 kDa .

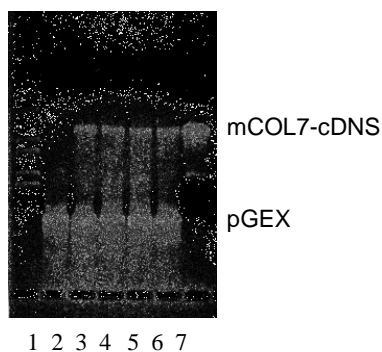


Abbildung 5. Verdau der Plasmid-tragenden Klone mit *Bam* H I und *Sal* I zur Prüfung der korrekten Insertion des cDNS-Fragments mCOL7C in den Vektor pGEX nach deren Ligation. Alle im Agarosegel dargestellten Plasmide lassen sich nach Verdau mit *Bam* H I und *Sal* I in pGEX (4984bp) und das cDNS-Fragment mCOL7C (630bp) zerlegen (*Spuren 3 bis 6*). Als Kontrolle wurde in *Spur 2* reines pGEX und in *Spur 7* reine mCOL7-cDNS geladen. In *Spur 1* wurde DNS-Marker III geladen.

Aufreinigung der Fusionsproteine

Das GST-Fusionsprotein pGEX-NC1-mCOLVIIC konnte nach Kultivierung der Bakterien über Nacht und Induktion der Proteinexpression mit IPTG erfolgreich exprimiert und mittels Glutathion-Agarose-Säulenchromatographie aufgereinigt werden (Abb. 6).

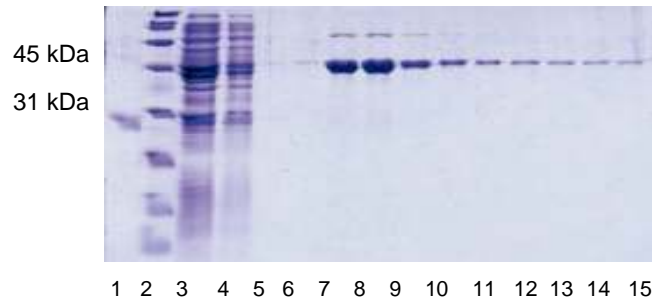


Abbildung 6. Aufreinigung des GST- mCOLVIIC. Nach Transfektion des *E.coli*-Stammes Rosetta blue mit dem cDNS für mCOLVIIC enthaltenden Vektor pGEX wurden die Bakterien in LB-Medium kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Nach Aufreinigung der Proteine mit Hilfe einer Glutathion-Agarose-Matrix und Elution mittels 0,01 M Glutathion in PBS pH 7,5 wurden die Fraktionen mit dem Protein auf ein 15% Polyacrylamidgel geladen und mit 90 mA bei RT 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. In den Spuren 5 bis 15 wurden die aufgereinigten Fusionsproteine, in den Spuren 3 und 4 die Durchlaufaktionen, in Spur 2 der Molekulargewichtsmarker und in Spur 1 aufgereinigtes GST geladen. Das Fusionsprotein GST-NC1-mCOLVIIC migriert entsprechend seiner berechneten Größe von 49,5 kDa.

Die Fusionsproteine A und B konnten trotz erfolgreicher Expression nicht nach dem gleichen Protokoll wie das Fusionsprotein C aufgereinigt werden, da diese sich durch Einschlusskörperchenbildung in den Bakterien als PBS unlöslich erwiesen.

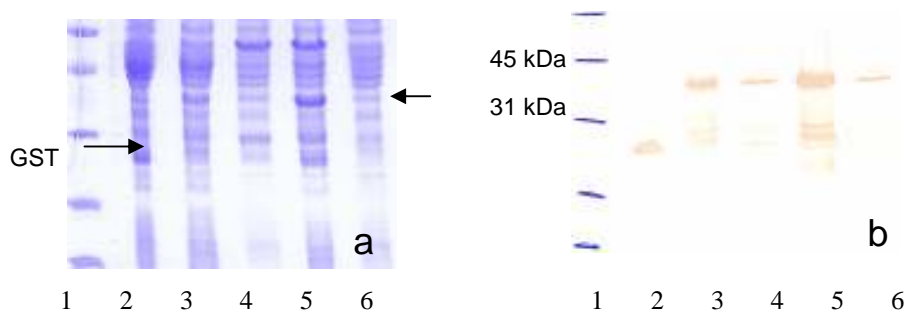


Abbildung 7. Die Fragmente GST-NC1-mCOLVIIA und GST-NC1-mCOLVIIB sind in 8 M Harnstoff aber nicht in PBS löslich. Die in *E. coli* exprimierten unaufgereinigten GST-Fusionsproteine GST-NC1-mCOLVIIA und B wurden in 8 M Harnstoff (jeweils Spuren 3 und 5) und in PBS (jeweils Spur 4 und 6) aufgenommen. Die gelösten Fusionsproteine wurden mittels 15% Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie Blau gefärbt (a) oder mittels Immunoblot mit Kaninchenserum SA 8009 gegen rekombinantes GST (b) sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine deutlich bessere Löslichkeit der Fusionsproteine in 8 M Harnstoff als in PBS.

Mit Hilfe des Protokolls zur Aufreinigung von Einschlusskörperchen (s.S. 15), gelang es, die Fragmente A und B in PBS-löslicher Form aufzureinigen (Abb. 8 und 9).

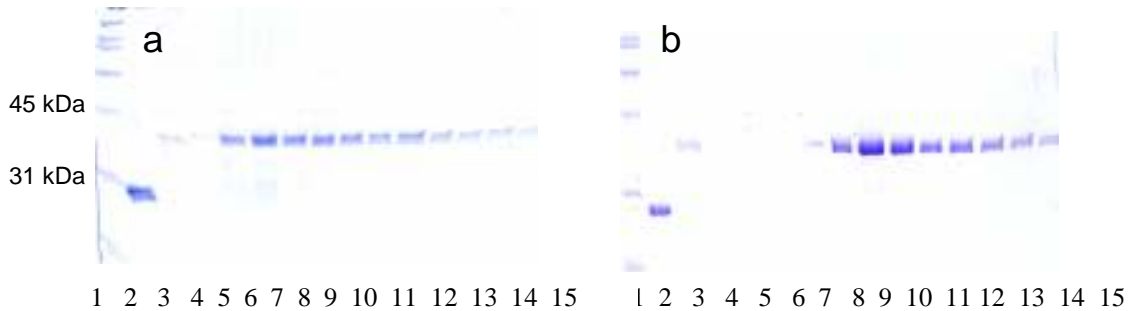


Abbildung 8. Darstellung der aufgereinigten Fusionsproteine GST-NC1-mCOLVIIA (a) und GST-NC1-mCOL7B (b) nach Löslichkeitsverbesserung der Einschlußkörperchen. Die Proteine migrieren entsprechend ihres erwarteten Molekulargewichts von 38,8 kDa für GST-NC1-mCOL7A (*Spuren 3 bis 15*) und 38,2 kDa für GST-NC1-mCOL7B (*Spuren 3 bis 15*). In *Spur 1* wurde Molekulargewichtsstandard geladen.

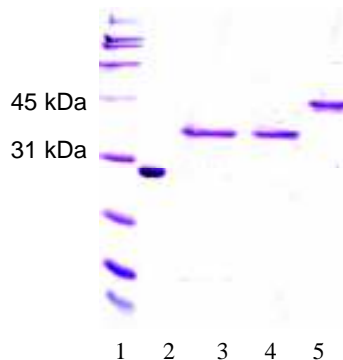


Abbildung 9. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine migrieren im 15% Polyacrylamidgel entsprechend ihrer berechneten Größe. Nach Expression in *E. coli* und Aufreinigung mittels Glutathion-Agarose-Matrix wurden die Fusionsproteine gegen PBS dialysiert, lyophilisiert und in destilliertem Wasser resuspendiert. GST-NC1-mCOLVIIA migriert bei 38,8 kDa (*Spur 3*), GST-NC1-mCOLVIIB bei 38,2 kDa (*Spur 4*) und GST-NC1-mCOLVIIC bei 49,5 kDa (*Spur 5*). In *Spur 1* wurde der Molekulargewichtsmarker und in *Spur 2* aufgereinigtes GST geladen.

Charakterisierung der Kaninchenantikörper gegen Typ VII Kollagen

Die Kaninchen SA 2953 und SA 2954 wurden mit 200 µg äquimolarer in komplettem Freundschens Adjuvans resuspendierter Mixtur der drei aufgereinigten GST-Fusionsproteine zweimal im Abstand von 15 Tagen immunisiert. In Abständen von vier Wochen wurden die Seren SA 2953 und SA 2954 mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf Gefrierschnitten normaler Maushaut auf IgG-Antikörperreaktivität getestet (Abb. 10b). Es zeigten sich lineare IgG-Ablagerungen entlang der DEJ, wobei ein Antikörpertiter von 1:163840 erreicht wurde.

Nach Inkubation muriner und humaner Haut mit dem IgG aus Serum immunisierter Kaninchen und nach Zugabe von frischem Mausserum als Komplementquelle wurden C3-Ablagerungen mit einem C3-spezifischen Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie entlang der DEJ visualisiert (Abb. 10 f). Keine Ablagerungen fanden sich nach Inkubation mit Präimmunserum.

Professor Akira Ishiko (Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan) führte in Zusammenarbeit mit uns die indirekte Immunelektronenmikroskopie durch und konnte die Lamina densa als ultrastrukturelle Bindungsstelle der Kaninchen-Antikörper charakterisieren (Abb. 10 d).

Um die Fähigkeit der Kaninchenantikörper zur subepidermalen Spaltbildung zu testen, wurden Kaninchen-IgG mit Gefrierschnitten muriner und humaner Haut inkubiert. Nach Zugabe von Leukozyten entwickelte sich eine Spaltbildung entlang der dermo-epidermalen Übergangszone (Abb. 10 g). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den mit IgG aus Präimmunseren behandelten Gefrierschnitten keine dermo-epidermale Separation (Abb. 10 h).

Zusätzlich wurde mittels Immunoblotanalyse die Reaktivität der Kaninchen-IgG mit nativem Typ VII Kollagen aus Extrakten muriner Dermis untersucht. Es zeigte sich, dass IgG aus Immun-, aber nicht Präimmunseren an das Typ VII Kollagen der dermalen Extrakte bindet (Abb. 10 e).

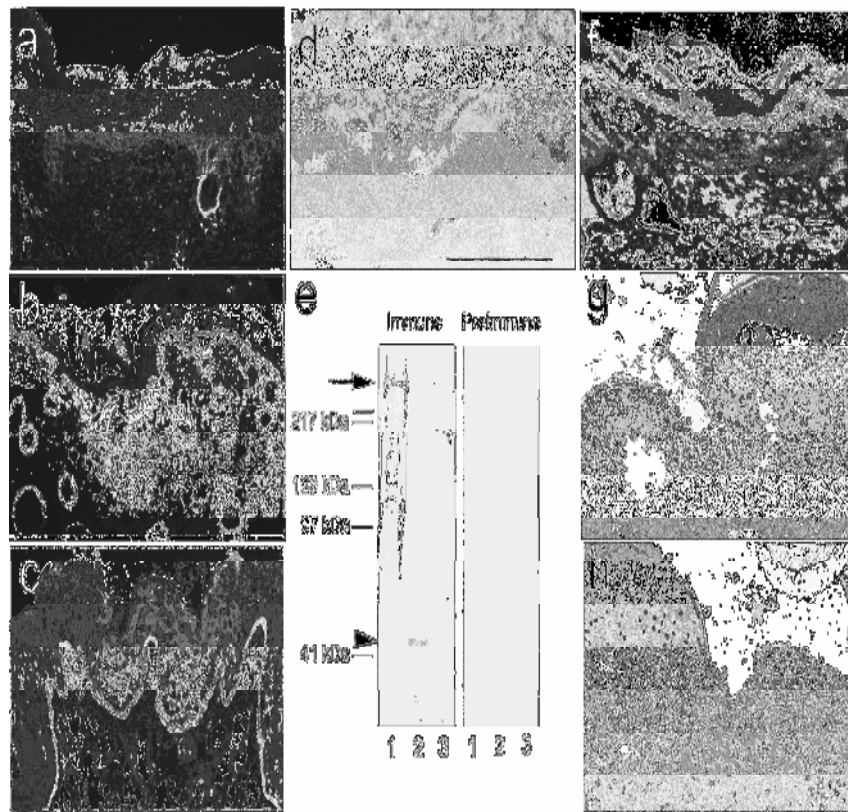


Abbildung 10. Serum-IgG des Kaninchen SA 2954 bindet an die DEJ, erkennt Typ VII Kollagen, aktiviert Leukozyten und Komplement und induziert eine dermo-epidermale Separation *in vitro*. Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie des Kaninchenserum SA 2954 auf Gefrierschnitten zeigt vor Immunisierung keine spezifische Anfärbung (a); nach Immunisierung mit rekombinantem Typ VII Kollagen bindet Kaninchen-IgG an die DEJ von muriner (b) und humaner Haut (c) (x250). In der indirekten Immunelektronenmikroskopie (d) bindet IgG aus dem Serum immunisierter Kaninchen an die Lamina densa der Maushaut. Scale bar: 0,5 μ m. Extrakte muriner Dermis (*Spur 1*) und äquimolare Mengen von GST-mCOLVIIIC (*Spur 2*) und GST (*Spur 3*) wurden mittels eines 4-20% Gradientengels separiert, transferiert und die Nitrozellulose-Streifen mit GST-präadsorbiertem Präimmunserum im Immunoblot dargestellt (e). IgG aus Serum immunisierter Kaninchen, aber nicht aus Serum der Kaninchen vor Immunisierung, bindet sowohl an Typ VII Kollagen der dermalen Extrakte (Pfeil) als auch an das rekombinante Fragment C des Typ VII Kollagens (Pfeilspitze). Gefrierschnitte der Maushaut wurden mit Serum immunisierter Kaninchen und frischem Serum, das als Komplementquelle diente, inkubiert. An die DEJ gebundenes murines C3 wurde immunfluoreszenzmikroskopisch visualisiert (f) (x250). Bei Ko-Inkubation von Gefrierschnitten humaner Haut in Anwesenheit humaner Leukozyten und IgG aus Serum immunisierter Kaninchen kommt es zur dermo-epidermale Separation (g) (x400). Bei Inkubation mit IgG aus Präimmunserum entwickelt sich keine dermo-epidermale Spaltbildung (h).

In der Immunoblot-Analyse zeigte sich, dass Immunseren spezifisches IgG gegen rekombinantes Typ VII Kollagen enthalten. Dabei wurde die polyklonale IgG-Reaktivität der Immunseren SA 2953 und SA 2954, sowie präimmuner Seren, mit den drei rekombinanten GST-Fusionsproteinen GST-NC1-mCOLVIIA, GST-NC1-mCOLVIIB und GST-NC1-mCOLVIIC in äquimolaren Konzentrationen untersucht. IgG aus den Seren SA 2953 und SA 2954 zeigte die stärkste Reaktivität mit GST-NC1-mCOLVIIC, geringere Reaktivität mit GST-NC1-mCOLVIIB und fast keine Reaktivität mit GST-NC1-mCOLVIIA (Abb. 11).

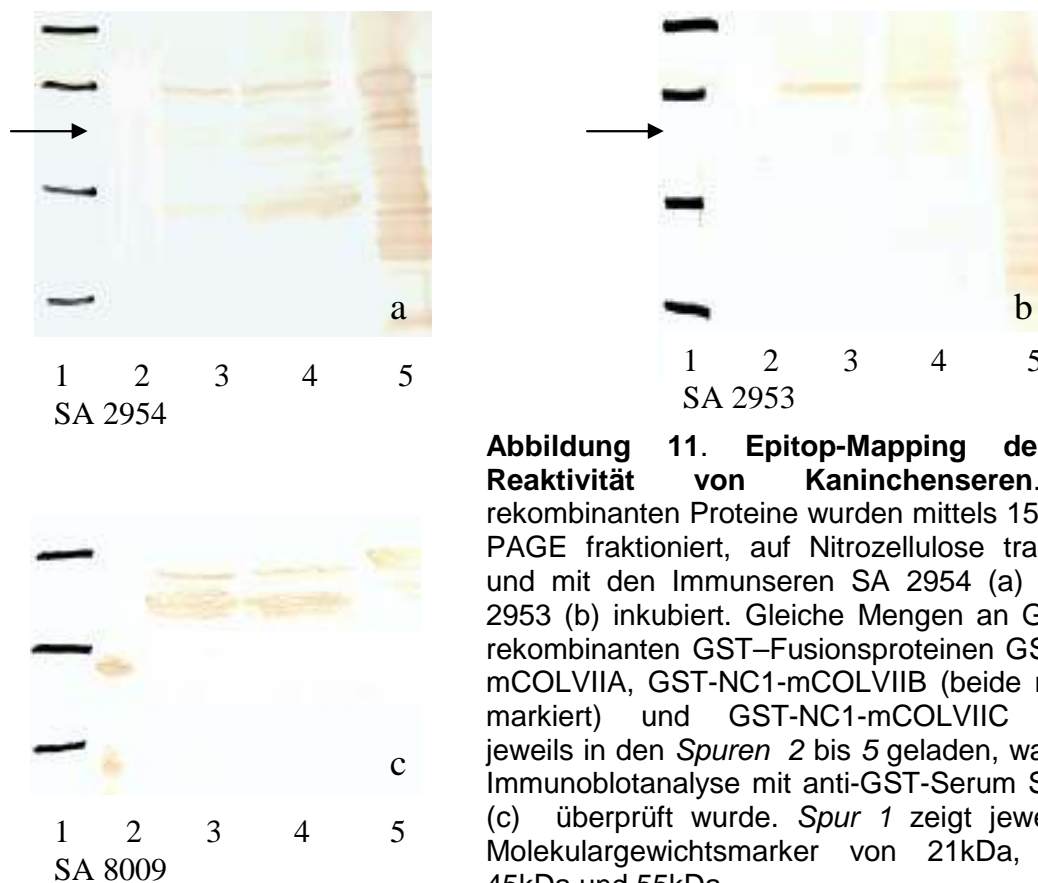


Abbildung 11. Epitop-Mapping der IgG-Reaktivität von Kaninchenseren. Die rekombinanten Proteine wurden mittels 15% SDS-PAGE fraktioniert, auf Nitrozellulose transferiert und mit den Immunseren SA 2954 (a) und SA 2953 (b) inkubiert. Gleiche Mengen an GST und rekombinanten GST-Fusionsproteinen GST-NC1-mCOLVIIA, GST-NC1-mCOLVIIB (beide mit Pfeil markiert) und GST-NC1-mCOLVIIC wurden jeweils in den Spuren 2 bis 5 geladen, was durch Immunoblotanalyse mit anti-GST-Serum SA 8009 (c) überprüft wurde. Spur 1 zeigt jeweils den Molekulargewichtsmarker von 21kDa, 31kDa, 45kDa und 55kDa.

Mit IgG aus Kaninchenimmunseren injizierte Mäuse entwickeln Blasen der Haut

Erwachsenen BALB/c Mäusen wurde in unterschiedlichen Dosen aufgereinigtes Kaninchen-IgG aus Seren immunisierter und nicht immunisierter Kaninchen injiziert. Innerhalb von 24-48 h nach der ersten Injektion entwickelten Mäuse, die 15 mg (n=4) bzw. 7,5 mg (n=4) Typ VII Kollagen-spezifische IgG erhielten, Blasen im Bereich von Schwanz und Ohren (Abb. 12 a, b). In der Gruppe von Mäusen, die 3,75 mg IgG/Injektion (n=4) erhielten, waren Hautläsionen erst nach 48-72 h zu beobachten. Bei allen Mäusen, die Typ VII Kollagen-spezifisches IgG erhalten hatten, konnte mit leichtem seitlichem Druck das Lösen und Abschälen der Epidermis provoziert werden (Nikolski-Phänomen) (Abb. 12 c, d, e). Die Blasen gingen in Erosionen, die teilweise von Krusten bedeckt wurden, über (Abb. 12 f). Innerhalb weniger Tage erschienen an Rumpf und Gliedmaßen ebenfalls Blasen und Erosionen (Abb. 12 a, f). Mäuse, denen Kontroll-IgG injiziert wurde (n=4), zeigten keine Hautläsionen während des gleichen Beobachtungszeitraumes (Abb. 12 g, h, i). Keine der Mäuse zeigte Verhaltensänderungen.

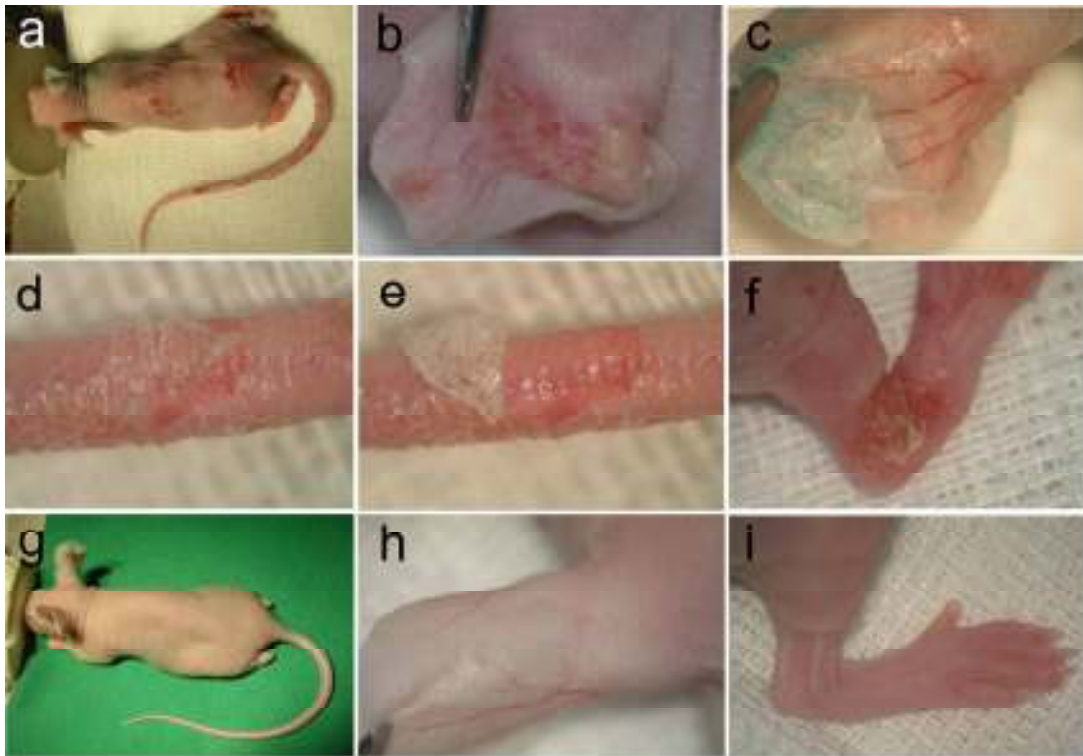


Abbildung 12. IgG gegen Typ VII Kollagen induziert kutane Läsionen in Mäusen. (a) Ausgedehnte Hautläsionen mit Blasen, Erosionen und Ablösung der Epidermis bei einer BALB/c^{nu/nu} Maus, die über einen Zeitraum von 10 Tagen fünf Injektionen mit jeweils 7,5 mg IgG aus dem Serum eines gegen Typ VII Kollagen immunisierten Kaninchens erhielt. Injektionen in den Rücken der Maus induzierten spontane Blasenbildung am linken Ohr (b) und nach tangentialer Druckausübung das Ablösen der Epidermis am rechten Ohr (c). Eine Ablösung der Epidermis konnte auf diese Weise auch am Schwanz provoziert werden (d). Es war zudem möglich, die Epidermis von der Dermis abzuheben (e). Krustenbedeckte Erosionen am Hinterbein (f). Eine Kontrollmaus zeigte nach Injektionen mit normalem Kaninchen IgG in derselben Dosis keine Hautveränderungen (g, h, i).

Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie von Biopsien injizierter Mäuse

In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie periläsionaler Maushaut (Abb. 13 a, b) zeigten sich lineare IgG- und C3-Ablagerungen (Abb. 13 a, b, d) entlang der Basalmembran. Ebenso waren lineare Ablagerungen von IgG und C3 im Ösophagus (Abb. 13 d) und weniger ausgeprägt im Kolon der mit Typ VII Kollagen-spezifischen Antikörpern injizierten Mäuse nachweisbar. Die Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 13 c) läsionaler Maushaut weist abgelagertes IgG sowohl auf der dermalen als auch auf der epidermalen Seite des Spaltes auf. Entlang der DEJ von Kontrollmäusen (Abb. 13 e, f), die IgG nicht immunisierter Kaninchen erhielten, konnten keine IgG- oder C3-Ablagerungen gefunden werden.

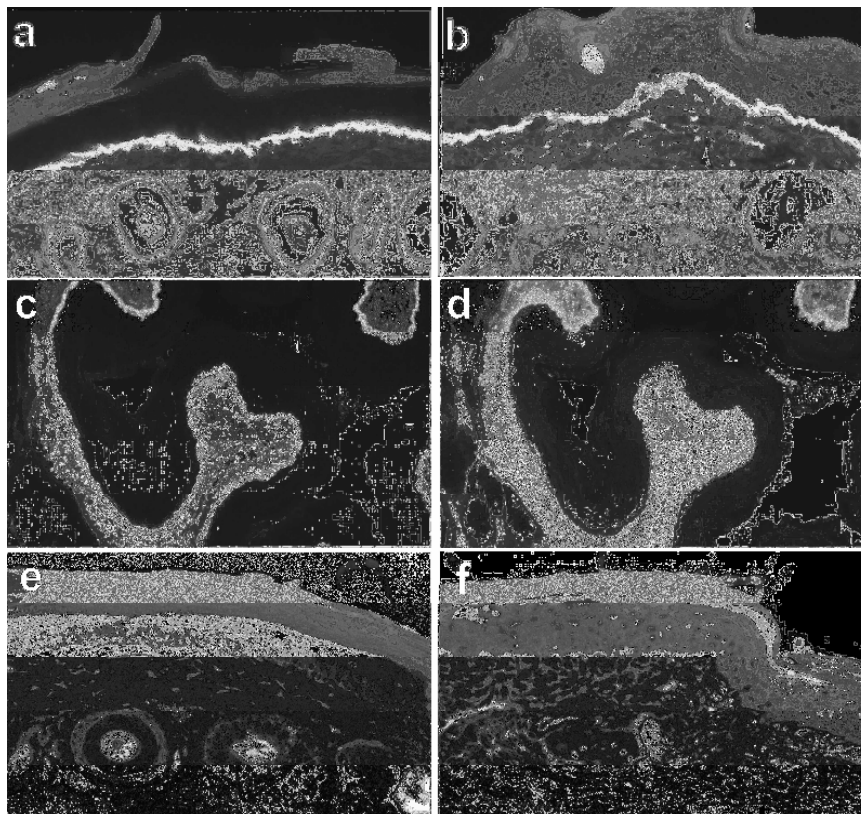


Abbildung 13. Kaninchen-IgG gegen Typ VII Kollagen bindet an die Basalmembran und fixiert Komplement *in vivo*. Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Hautbiopsien (a, b) und Ösophagusbiopsien (d) zeigte lineare Ablagerungen von Kaninchen-IgG (a, d) und murinem C3 (b) an der Basalmembran. Die direkte Immunfluoreszenz läsionaler Hautbiopsien zeigte Kaninchen-IgG-Ablagerungen entlang der epidermalen und dermalen Spaltseite (c). In Hautbiopsien der mit Kontroll-IgG injizierten Mäuse lassen sich weder IgG- (e) noch C3- (f) Ablagerungen nachweisen (x250).

Histologie und Elektronenmikroskopie von Hautbiopsien injizierter Mäuse

Von jeder Maus wurden drei läsionale Hautbiopsien histopathologisch untersucht. Bei allen Mäusen, die Antikörper gegen Typ VII Kollagen erhielten, zeigte sich eine dermo-epidermale Separation (Abb. 14 a), die von einem überwiegend neutrophilen Entzündungsinfiltrat begleitet wurde (Abb. 14 a, b). Im Ösophagus und Kolon konnten keine pathologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Hautbiopsien der Mäuse, die Kontroll-IgG erhielten, zeigten keine spezifischen histologischen Veränderungen (Abb. 14 c).

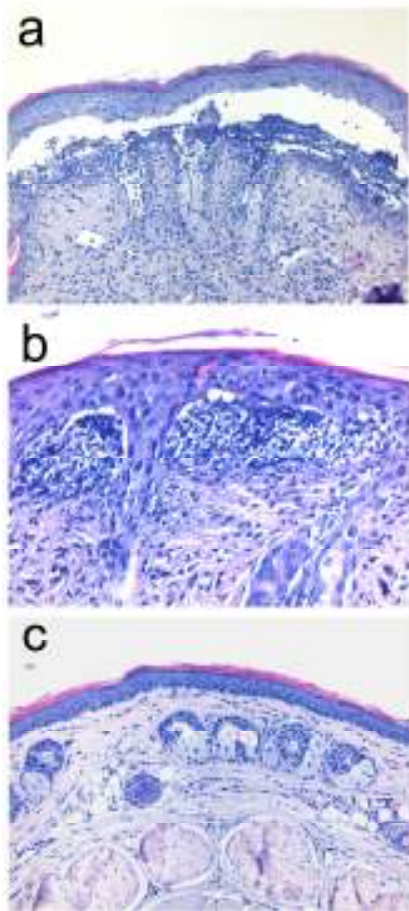


Abbildung 14. Lichtmikroskopische Darstellung der durch Typ VII Kollagen-spezifischen Antikörper verursachten subepidermalen Spaltbildung. (a) Die histologische Untersuchung einer läsionalen Hautbiopsie einer erkrankten Maus zeigt eine subepidermale Spaltbildung (x200); (b) die entzündlichen Infiltrate werden von neutrophilen Granulozyten dominiert (x400). (c) Bei mit Kontroll-IgG injizierten Mäusen wurden keine spezifischen histologischen Veränderungen gefunden (x200).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der läsionalen und periläsionalen Biopsien wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ingrid Hausser (Universität Heidelberg) durchgeführt und zeigten eine Spaltbildung in der oberen Dermis. Die Lamina densa stellte sich im Blasendach dar und haftete an basalen Keratinozyten, die intakte Hemidesmosomen zeigten (Abb. 15).

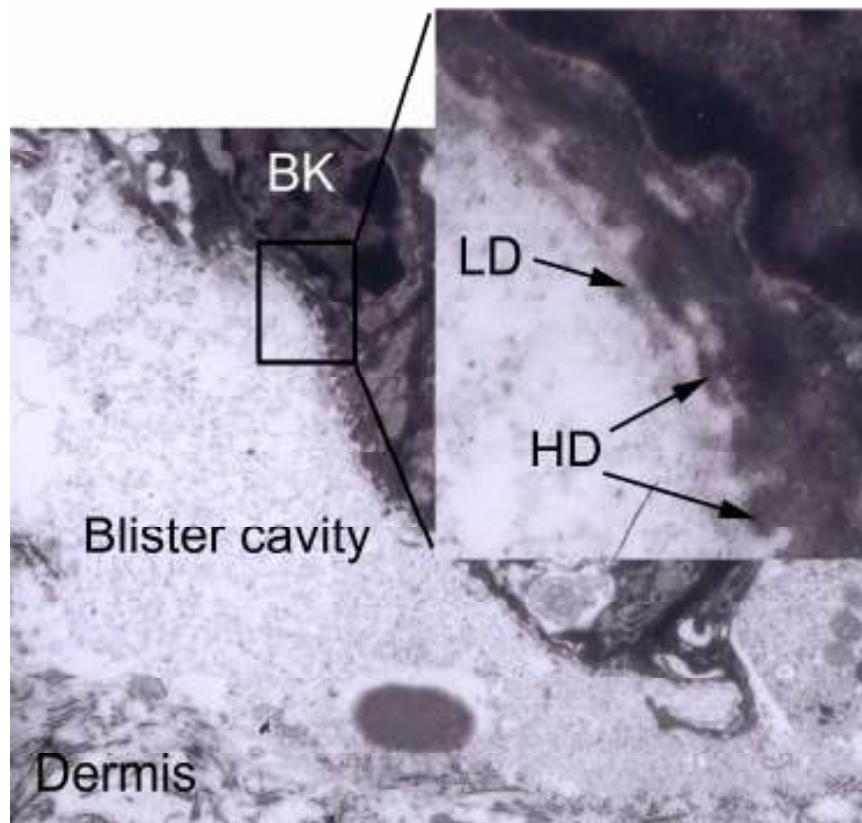


Abbildung 15. Ultrastrukturell liegt die Spaltbildung, die durch Kaninchenantikörper gegen Typ VII-Kollagen induziert wird, unterhalb der Lamina densa. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hautbiopsien erkrankter Mäuse zeigen, dass das Blasendach die Lamina densa (LD) enthält, die an basalen Keratinozyten (BK) haftet. Die Hemidesmosomen (HD) sind intakt (x11 000; Ausschnitt: x44 000). Darstellung der Blasenhöhle (Blister cavity) und Dermis.

In erkrankten Mäusen korreliert das Ausmaß der Hautläsionen mit den Titern zirkulierender Serumantikörper gegen Typ VII Kollagen

Serumproben wurden den Tieren vor der Injektion sowie 4, 8 und 12 Tage nach der Injektion entnommen und die Antikörperreaktivität mit der DEJ mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Titer der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden unter Verwendung der Spearman's rank Korrelation mit dem Erkrankungsausmaß zu den vier Zeitpunkten verglichen. Es zeigte sich eine positive Korrelation beider Untersuchungsparameter ($r = 0,94$; $p < 0,01$). Zusätzlich wurde die Relation zwischen Erkrankungsausmaß und der Dosis des injizierten IgG bestimmt. Das Erkrankungsausmaß stieg signifikant an bei Mäusen, denen 7,5 und 15 mg IgG injiziert wurde, im Vergleich zu Mäusen, die 3,75 mg IgG erhielten (Abb. 16). Es

wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen, die 7,5 mg IgG und 15 mg IgG erhielten, gefunden.

Tabelle 3. Das Erkrankungsausmaß korreliert mit der injizierten IgG-Dosis

Maus	IgG	IgG-Dosis(mg) ^A		Erkrankungsausmaß ^B				IgG-Reaktivität ^C			
		Pro Injektion	Total	0	4	8	12 ^D	0	4	8	12
1	SA2953	15	90	0	2	3	4	0	320	1280	5120
2	SA2954	15	90	0	1	2	4	0	320	640	5120
3	SA2953	15	90	0	2	2	4	0	320	640	5120
4	SA2954	15	90	0	2	2	4	0	320	1280	5120
5	SA2953	7,5	45	0	2	3	4	0	1280	1280	5120
6	SA2954	7,5	45	0	2	2	3	0	320	640	2560
7	SA2953	7,5	45	0	2	3	4	0	640	1280	2560
8	SA2954	7,5	45	0	1	2	3	0	320	640	640
9	SA2953	3,75	22,5	0	1	1	2	0	160	160	1280
10	SA2954	3,75	22,5	0	1	1	2	0	160	160	1280
11	SA2953	3,75	22,5	0	1	1	2	0	160	160	1280
12	SA2954	3,75	22,5	0	1	1	2	0	160	160	1280
13	NR	15	90	0	0	0	0	0	0	0	0
14	NR	15	90	0	0	0	0	0	0	0	0
15	NR	7,5	45	0	0	0	0	0	0	0	0
16	NR	7,5	45	0	0	0	0	0	0	0	0

^AIgG-Menge, die passiv in Mäuse transferiert wurde; SA 2953 und SA 2954: IgG der Kaninchen, die mit rekombinanten Peptiden der NC1-Domäne des Typ VII Kollagens immunisiert wurden; NR: IgG aus Kontrollserum nicht immunisierter Kaninchen. Die Wertung des ^BErkrankungsausmaßes: 0, keine Läsion; 1, < 20 Läsionen oder < 10% der Hautoberfläche; 2, > 20 Läsionen oder 10-20% der Hautoberfläche; 3, 20-40%; 4, 40-60%; und 5, >60% der Hautoberfläche; ^CIgG-Titer der indirekten Immunfluoreszenz auf Maushautschnitten zum letzten gemessenen Zeitpunkt; ^DErkrankungsausmaß und IgG-Reaktivität gegen die DEJ wurden vor Injektion (0) sowie 4, 8 und 12 Tage danach bestimmt.

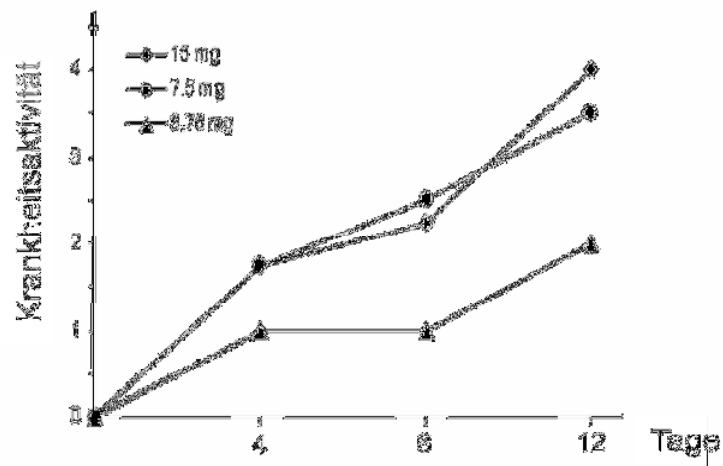


Abbildung 16. Das Ausmaß der Hauterkrankung in den Mäusen korreliert mit der injizierten Menge an Typ VII Kollagen-spezifischem Kaninchen-IgG. Die Bewertung des Erkrankungsausmaßes ist Tabelle 3 zu entnehmen. Darstellung der Durchschnittswerte der individuellen klinischen Punktzahlen (n=4) vor der Injektion sowie 4, 8 und 12 Tage später.

Diskussion

Sowohl klinische als auch *in vitro* Experimente legen nahe, dass es sich bei der EBA um eine antikörpervermittelte organspezifische Autoimmunerkrankung handelt (Gammon *et al*, 1984; Sitaru *et al*, 2002). Bisher konnte die Erkrankung in Tieren nicht erfolgreich reproduziert werden. Frühere Experimente zur Entwicklung eines Tiermodells für die EBA waren nicht erfolgreich. Dabei wurde versucht, Antikörper von Patienten mit EBA in neonatale oder in mit humaner Haut transplantierte SCID Mäuse zu injizieren (Tamaki *et al*, 1988; Yancey *et al* 1995; Kim *et al*, 1992). Die Ursache für die nicht gelungene Reproduktion der Erkrankung wurde in einer fehlenden Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Typ VII Kollagen oder in einer zu kurzen Interaktionszeit zwischen Antigen und Antikörper gesehen (Shigemoto *et al*, 1988; Borradori *et al*, 1995).

Für andere blasenbildende Erkrankungen wie z.B. das bullöse Pemphigoid, den Pemphigus oder das Anti-Laminin 5 Schleimhautpemphigoid wurden erfolgreich Tiermodelle entwickelt, deren Prinzip auf passivem Transfer antigenspezifischer Antikörper aus mit murinen Antigenen immunisierten Kaninchen beruhte (Liu *et al*, 1993; Memar *et al*, 1996; Lazarova *et al*, 1996). Analog hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit rekombinante Fragmente der nichtkollagenen NC1-Domäne des murinen Typ VII Kollagens hergestellt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die produzierten Kaninchenantikörper wurden charakterisiert und in BALB/c Mäuse injiziert, um eine blasenbildende Hauterkrankung zu induzieren, die der EBA des Menschen entsprechen würde.

Zur Herstellung des rekombinanten Typ VII Kollagens wurden Fragmente der NC1-Domäne gewählt, da diese durch die Autoantikörper von Patienten mit EBA präferenziell erkannt wird. Nur einige wenige EBA-Patienten zeigten zusätzliche Reaktivität mit der kollagenen oder NC2-Domäne (Woodley *et al*, 1988; Gammon *et al*, 1993; Lapiere *et al*, 1993; Tanaka *et al*, 1994; Chen *et al*, 2001; Schmidt *et al*, 2002). Deshalb wurde auf eine rekombinante Herstellung dieser Strukturen verzichtet.

Die zur Herstellung der Fragmente benötigte RNS wurde aus murinen Keratinozyten gewonnen und mittels reverser Transkription in cDNS umgewandelt. Speziell konstruierte Primer ermöglichten die Amplifizierung sowie den Einbau von Restriktionsendonukleasen in die cDNS. Durch Verdau der cDNS und des verwendeten Vektors pGEX-6P-1 mit den Restriktionsendonukleasen erfolgte die Ligation der Produkte. Die dadurch entstandenen rekombinanten Plasmide wurden zur Transformation von *E. coli* benutzt. Diese wurden kultiviert und zur Proteinexpression angeregt. Fragment C lag in wasserlöslicher Form vor, was eine einfache Aufreinigung mit der Glutathion-Agarose-Matrix ermöglichte. Die Fragmente A und B hingegen wurden in Form von Einschlusskörperchen exprimiert, was die Gewinnung dieser beiden Fragmente komplizierte.

Einschlusskörperchen stellen ein häufig beobachtetes Phänomen dar (Georgiou und Valax, 1996). Ursache für Ihre Formation ist im Wesentlichen eine Konkurrenz zwischen der proteinspezifischen Faltung und der Bildung von Aggregaten, die direkt mit der Syntheserate korreliert (Rudolph *et al*, 1996). Eine ausgeprägte Aggregation findet man vor allem bei sehr effektiven Expressionssystemen wie z.B. *E. coli*. Sie kann aber auch durch hohe Konzentrationen des Induktors, durch Verwendung komplexer Wachstumsmedien und durch höhere Temperaturen während der Kultivierung verursacht werden (Neubauer *et al*, 1996). Eine Veränderung der Wachstumsbedingungen durch niedrigere Temperaturen während der Kultivierung der *E. coli* und während der Induktion der Proteinexpression, sowie eine verkürzte Induktionszeit hatten bei uns keinen Einfluß auf die Einschlusskörperchenbildung. Die korrekte Entfaltung von Proteinen ist die Voraussetzung für deren Aufreinigung mit der Glutathion-Agarose-Matrix, da sich bei Aggregaten keine Disulfidbrücken, die Bestandteil des Bindungsprinzips an die Matrix sind, bilden können. Die Bildung der Disulfidbrücken stellt den wichtigsten limitierenden Faktor bei der Faltung von Proteinen in ihre natürliche Struktur dar und wird begünstigt durch reduzierende Redox-Bedingungen, wie sie im zytosolischen Milieu von *E. coli* vorliegen (Fahnert *et al*, 2004). Daher werden v.a. in der industriellen Herstellung therapeutischer Proteine verschiedene Ansatzpunkte zur Vermeidung der Einschlusskörperchenbildung diskutiert. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz ist die Expression von Proteinen in *E. coli*-Zellen, die Chaperon-Proteine in das Periplasma sezernieren. Dies hat zur Folge, dass periplasmatische Enzyme die Ausbildung der Disulfidbrücken

katalysieren und Proteine in ihrer physiologischen Struktur exprimiert werden können (Fahnert *et al*, 2004; Schwarz, 2002). Alternativ kann ein Protokoll genutzt werden, das die Gewinnung korrekt gefalteter Proteine aus bereits vorliegenden Einschlusskörperchen zum Ziel hat. Das Prinzip des von uns gewählten Protokolls beruht auf der umfangreichen Aggregatextraktion aus dem Expressionssystem, der Lösung der Aggregate, der Wiederfaltung und der anschließenden Renaturierung zur physiologischen Proteinstruktur (s.S.15). Zusätzlich zu dem von uns gewählten Verfahren zur Lösung und Renaturierung von Einschlusskörperchen existieren vielfältige Strategien, die auf der Vermeidung der Einschlusskörperchenbildung, der Aggregatextraktion und der Lösung der Proteine beruhen (Fahnert *et al*, 2004). Letztendlich ist das geeignete Prozedere zur Gewinnung und Aufreinigung der Einschlusskörperchen nicht vorhersagbar und je nach Protein individuell.

Nach erfolgreicher Aufreinigung der drei rekombinanten Typ VII Kollagen-Fragmente wurden 3 Kaninchen damit immunisiert und das Typ VII Kollagen-spezifische IgG aus den Kaninchenserum charakterisiert. Im Immunoblot zeigte sich eine positive Reaktivität von Kaninchen-IgG mit den drei zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Fragmenten des Typ VII Kollagens und mit nativem Typ VII Kollagen aus Extrakten muriner Dermis. Das Kaninchen-IgG zeigte die stärkste Immunoblotreaktivität mit GST-NC1-mCOLVIIC. Die Fragmente GST-NC1-mCOLVIIA und GST-NC1-mCOLVIIIB wurden etwas schwächer erkannt. Demnach kann Fragment C als das wesentliche Antigen in unserem Modellsystem angesehen werden.

Ähnlich wie IgG-Autoantikörper aus den Seren von Patienten mit EBA (Gammon *et al*, 1984) zeigte das IgG aus Serum immunisierter Kaninchen eine lineare Bindung an die dermale Seite normaler humaner NaCl-Spalthaut in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie. In der indirekten Immunelektronenmikroskopie stellte sich die Lamina densa als ultrastrukturelles Korrelat der Bindungsstelle für die Kaninchen-IgG-Antikörper dar. Dies stimmt mit Ergebnissen früherer immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen überein, die eine Reaktivität von Patientenautoantikörpern mit diesem Bereich der DEJ demonstrierten (Woodley *et al*, 1981). Diese Ergebnisse belegen die gelungene Immunisierung der Kaninchen und

die Vergleichbarkeit der antigenen Strukturen bzw. der damit assoziierten Antikörper im Serum von EBA-Patienten und im Serum immunisierter Kaninchen.

Im Komplement-Bindungstest konnte eine Interaktion zwischen Kaninchen-IgG und murinem C3 nachgewiesen und immunfluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. Dieses Phänomen wurde sowohl bei der Verwendung muriner als auch humaner Haut beobachtet und lässt auf eine Komplement-Aktivierungsfähigkeit des generierten Kaninchen-IgG schließen. Ebenso war es möglich, in Gefrierschnitten muriner und humaner Haut durch Inkubation mit Kaninchen-IgG und Zugabe von Leukozyten eine Spaltbildung innerhalb der dermo-epidermalen Junktionszone zu induzieren, wie sie bereits in Versuchen mit IgG aus EBA-Patientenseren demonstriert wurde (Sitaru *et al*, 2002). Zusätzlich zur Interaktion der generierten Antikörper mit Komplementfaktoren liegt also eine Interaktion mit Leukozyten vor, die ein wesentlicher Faktor bei der Induktion der dermo-epidermalen Separation und damit der Blasenbildung bei der EBA darstellt. Die Rolle des Komplementsystems bei der Spaltbildung kann anhand des Gefrierschnittmodells nicht sicher beurteilt werden.

Nach Ko-Inkubation von EBA-Seren und Leukozyten gesunder Spender mit muriner Haut bindet das humane IgG an die Maushaut und führt zur dermo-epidermalen Separation (Sitaru *et al*, 2002). Basierend auf der Annahme, dass Serumantikörper von EBA-Patienten mit murinem Typ VII Kollagen kreuzreagieren, wurden IgG-Antikörper von EBA-Patienten neonatalen Mäusen injiziert (Shigemoto *et al*, 1988; Borradori *et al*, 1995). Dies führte jedoch nicht zur Blasenbildung bei den Mäusen. Die Ursache für die mangelnde Reproduzierbarkeit der Erkrankung in diesen Tiermodellen bleibt unklar. Möglicherweise benötigen humane IgG-Antikörper gegen Typ VII Kollagen eine längere Interaktionszeit mit dem murinen Antigen und wurden über einen zu kurzen Zeitraum oder in zu geringer Dosis injiziert. Eine Bindung der humanen Antikörper an pathogenetisch nicht relevante Epitope des murinen Typ VII Kollagen oder nicht vorhandene bzw. zu geringe Aktivierung murinen Komplements und/oder muriner Leukozyten sind als weitere Ursachen zu diskutieren. Auch die unzureichende Sequenzhomologie mit einer Übereinstimmung von 82,5% zwischen muriner und humaner cDNA des Typ VII Kollagens könnte zur mangelnden Reproduzierbarkeit der EBA in den genannten Versuchen beitragen (Li *et al*, 1993).

Zukünftige Studien mit Antikörpern aus Seren von Patienten mit EBA werden zur Klärung dieser Frage beitragen.

Die IgG-Antikörper aus den Kaninchenseren wurden affinitätsaufgereinigt und in BALB/c^{nu/nu} Mäuse injiziert. Die IgG-Antikörper banden die dermo-epidermale Junktionszone der Maushaut, aktivierten das Komplement-System und induzierten abhängig von der injizierten Konzentration subepidermale Blasenbildung. 24-72 h nach Injektion entwickelten sich Blasen, wobei eine Dosis von 0,4 mg IgG/g Körpergewicht ausreichte. Die absolute Menge IgG, die nötig ist, um Blasenbildung zu induzieren, ist in unserem System geringer als in anderen passiven Transfermodellen humaner blasenbildender Erkrankungen (Liu *et al*, 1993, Memar *et al*, 1996; Lazarova *et al*, 1996; Anhalt *et al*, 1982). Die Hautläsionen entwickelten sich zuerst in von der Injektionsstelle entfernten Regionen wie Schwanz und Ohren, später an Beinen und Rumpf. Daraus lässt sich schließen, dass die injizierten IgG-Antikörper systemisch ausbreiten. Weiterhin wird diese Annahme dadurch untermauert, dass das Kaninchen-IgG während eines Beobachtungszeitraumes von zwei Wochen in einer hohen Konzentration im peripheren Blut der Mäuse zu finden ist. Darüber hinaus korreliert die Ausdehnung der Erkrankung mit den Immunfluoreszenztitern der Kaninchenantikörper im Serum der Mäuse. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Daten aus unserem *in vitro*-Modell der EBA. In diesem Modell kommt es zu einer dosisabhängigen Induktion der dermo-epidermalen Spaltbildung durch humane Leukozyten und durch Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen (Sitaru *et al*, 2002).

Immunpathologisch ist die EBA durch in der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbare lineare Ablagerungen von IgG und C3 an der DEJ charakterisiert. Immuielektronenmikroskopisch sind diese im Bereich von Lamina densa und Sublamina densa der DEJ lokalisiert (Yaoita *et al*, 1981). Mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie und direkter Immuielektronenmikroskopie läsionaler Hautbiopsien der erkrankten Mäuse wurden solche IgG- und C3-Ablagerungen auch in unserem Modell demonstriert.

Hautbiopsien der experimentellen Tiere wiesen als histologische Merkmale subepidermale Blasen und neutrophile Entzündungsinfiltrate auf. Diese Merkmale

sind typischerweise auch in der Haut von EBA-Patienten zu finden (Hallel-Halevy *et al*, 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die dermo-epidermale Spaltbildung in der Haut der experimentellen Tiere ähnlich wie bei Patienten mit EBA im Bereich der Lamina densa erfolgte (Nieboer *et al*, 1980). In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Antikörperablagerungen zwar immer die Region der Lamina densa bzw. Sublamina densa betreffen, die dermo-epidermale Separation jedoch bei manchen Patienten nicht in der Lamina densa, sondern in der Lamina lucida der DEJ lokalisiert ist (Fine *et al*, 1989).

Die Reproduktion einer Erkrankung in Versuchstieren mittels passiven Transfers pathogener Antikörper gilt als direktes Beweiskriterium für ihre autoimmune Genese (Rose und Bona, 1993). Die erfolgreiche Herstellung Typ VII Kollagen-spezifischer Kaninchen-IgG, die Übereinstimmung der Charakteristika der generierten Antikörper mit IgG-Serumantikörpern von Patienten mit EBA und die Induktion einer EBA-ähnlichen Hauterkrankung in den injizierten Mäusen belegen die pathogenetische Relevanz von anti-Typ VII Kollagen-Antikörpern und bestätigen die Annahme, dass es sich bei der EBA um eine Autoimmunerkrankung handelt.

Schlußfolgerung

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir zum ersten Mal, dass der passive Transfer von Typ VII-Kollagen-spezifischen Antikörpern in BALB/c Mäuse zur Reproduktion aller klinischen, histologischen und immunpathologischen Merkmale der humanen Erkrankung EBA in den Tieren führt. Dieses Modell ist für weitere Untersuchungen zu zellulären und molekularen Mechanismen der subepidermalen Blasenbildung bei der EBA gut geeignet. Darüber hinaus könnte es zur Entwicklung neuer, effektiverer Therapieformen für diese schwere Autoimmunerkrankung beitragen.

Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose, die durch zirkulierende und gewebegebundene Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) gekennzeichnet ist. Das Autoantigen, das durch EBA-Antikörper erkannt wird, ist Typ VII Kollagen, ein 290 kDa schweres Protein dermalen Verankerungsfibrillen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Autoantikörper von Patienten mit EBA präferentiell die 145 kDa schwere, nichtkollagene (NC) 1-Domäne von Typ VII Kollagen erkennen. Bemühungen, die pathogenetische Bedeutung von Typ VII Kollagen-spezifischen Antikörpern zu beweisen, waren bislang jedoch nicht erfolgreich gewesen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein murines passives Transfermodell für die EBA zu entwickeln und die pathogenetische Relevanz von anti-Typ VII Kollagen-Antikörpern zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mehrere Fragmente der NC1-Domäne von Typ VII Kollagen rekombinant hergestellt und zur Immunisierung von neuseeländischen Weißkaninchen eingesetzt. Nach Aufreinigung und Charakterisierung des generierten Typ VII Kollagen-spezifischen Kaninchen-IgG wurde dieses in BALB/c Mäuse injiziert. Das Kaninchen-IgG zeigte spezifische Bindung an die murine und humane dermo-epidermale Junktionszone, erkannte natives Typ VII Kollagen im Immunoblot mit Extrakten muriner Dermis und induzierte eine dermo-epidermale Separation in Kryoschnitten muriner und humaner Haut bei Ko-Inkubation mit Leukozyten und Komplement. Bei Mäusen, die Typ VII Kollagen-spezifisches Kaninchen-IgG erhielten, fanden sich dosisabhängig zirkulierende anti-Typ VII Kollagen-Antikörper im peripheren Blut, Ablagerungen von Kaninchen-IgG und murinem C3 entlang der dermo-epidermalen Junktionszone sowie subepidermale Blasen an der Haut. Kontrolltiere, die gleiche Mengen an normalem Kaninchen-IgG bekamen, zeigten keine pathologischen Veränderungen. Unsere Untersuchungen etablieren erstmals ein passives Transfermodell für die EBA, welches für Untersuchungen der pathogenetischen Mechanismen und neuer therapeutischer Ansätze bei dieser Erkrankung eingesetzt werden kann.

Literaturverzeichnis

Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. und Stanley, J.R. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; 67: 869-77.

Anhalt, G.J., Labib, R.S., Voorhees, J.J., Beals, T.F., und Diaz, L.A. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 1189-96.

Bentz, H., Morris, N.P., Murray, L.W., Sakai, L.Y., Hollister, D.W., und Burgeson, R.E. Isolation and partial characterization of a new human collagen with extended triple-helical structural domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3168-72.

Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedance, C., Arbeille, B., Denoeux, J.P., Lorette, G., Bonnetblanc, J.M., und Prost, C. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three french regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol* 1995; 131: 48-52.

Bernard, P., Prost, C., Aucouturier, P., Durepaire, N., Denis, F., und Bonnetblanc, J.M. The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1991; 97:259-63.

Bhol, K.C., Dans, M.J., Simmons, R.K., Foster, C.S., Giancotti, F.G., und Ahmed, A.R. The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human beta 4. *J Immunol* 2000; 165: 2824-9.

Bhol, K.C., Goss, L, Kumari, S., Colon, J.E., und Ahmed, A.R. Autoantibodies to alpha 6 integrin in patients with oral pemphigoid. *J Dent Res* 2001; 80: 1711-5

Borradori, L., Caldwell, J.B., Briggaman, R.A., Burr, C.E., Gammon, W.R., James, W.D., und Yancey, K.B. Passive transfer autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Arch Dermatol* 1995; 131: 590-5.

Bruckner-Tuderman, L., Nilsson, O., Zimmermann, D.R., Dours-Zimmermann, M.T., Kalinke, D.U., Gedde-Dahl, T., Jr., und Windberg, J.-O. Immunohistochemical and mutation analyses demonstrate that procollagen VII is processed to collagen VII through removal of the NC-2 domain. *J Cell Biol* 1995; 131: 551-9.

Bruckner-Tuderman, L., Mitsuhashi, Y., Schnyder, U.W., und Bruckner, P. Anchoring fibrils and type VII collagen are absent from skin in severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 3-9.

Bruckner-Tuderman, L., Niemi, K.M., Kero, M., Schnyder, U.W., und Reunala, T. Type VII collagen is expressed but anchoring fibrils are defective in dystrophic epidermolysis inversa. *Br J Dermatol* 1990; 122: 383-90.

Callot-Mellot, C., Bodemer, C., Caux, F., Bourgault-Villada, I., Freitag, S., Goudie, G., Heller, M., de Prost, Y., und Prost, C. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1122-6.

Caux, F., Kirtschig, G., Lemarchand-Venencie, F., Venencie, P.Y., Hoang-Xuan, T., Robin, H., Dubertret, L., und Prost, C. IgA-epidermolysis bullosa acquisita in a child resulting in blindness. *Br J Dermatol* 1997; 137: 270-5.

Chen, D.M., Welsh, E.A., Woodley, D.T., Wynn, K.C., Briggaman, R.A., und Kim, Y.H. Passive transfer of epidermolysis bullosa acquisita antibody into xenotransfused SCID mice with human grafts. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 589 (Abstract).

Chen, M., Keene, D.R., Costa, A.M., Tahk, S.H., und Woodley, D.T. The carboxy - terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis bullosa acquisita antibodies. *J Biol Chem* 2001; 276: 21649-55.

Cho, H.J., Lee, I.J., und Kim, S.C. Complement-fixing abilities and IgG subclasses of autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *Yonsei Med J* 1998; 39: 339-44.

Christiano, A.L., Greenspan, D.S., Lee, S., und Uitto, J. Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphism. *J Biol Chem* 1994a; 269: 20256-62.

Christiano, A. M., Greenspan, D.S., Hoffman, G.G., Zhang, X., Tamai, Y., Lin, A.N., Dietz, H.C., Hovnanian, H., und Uitto, J. A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 1993; 4: 62-6.

Christiano, A.M., Ryynanen, M., und Uitto, J. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa: identification of a Gly-> Ser substitution in the triple helical domain of type VII collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994b; 91: 3549-53.

Dahl, M.G. Epidermolysis bullosa acquisita – a sign of cicatricial pemphigoid ? *Br J Dermatol* 1979; 101 : 475-84.

Diaz, L.A., Ratrie, H.D., Saunders, W.S., Futamura, S., Squiquera, H.L.; Anhalt, G.J., und Guidice, G.J. Isolating of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationes sera. Immunolocalisation of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990; 86: 1088-94

Domloge-Hultsch, N., Gammon, W.R., Briggaman, R.A., Gil, S.G., Carter, W.G., und Yancey, K.B. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a targetin both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 1628-33

Elliot, G.T. Two cases of epidermolysis bullosa acquisita. *J Cutan Genitourin* 1895 ; 13: 10.

Fahnert, B., Lilie, H., und Neubauer, P. Inclusion bodies: Formation and utilisation. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2004; 89: 93-142.

Fine, J.D., Tying, S., und Gammon, W.R. Functional heterogeneity of immune complexes in epidermolysis bullosa acquisita: possible role of leukocytes. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 27-32

Gammon, W.R. and Briggaman, R.A. Functional heterogeneity of immune complexes in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1987; 89: 478-83.

Gammon, W.R., Briggaman, R.A., und Wheeler, C.E., Jr. Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 382-7.

Gammon, W.R., Briggaman, R.A., Woodley, D.T., Heald, P.W., und Wheeler, C.E., Jr. Epidermolysis bullosa acquisita - a pemphigoid-like disease. *J Am Acad Dermatol* 1984b; 11: 820-32.

Gammon, W.R., Murrell, D.F., Jenison, M.W., Padilla, K.M., Prisayanh, P.S., Jones, D.A., Briggaman, R.A., und Hunt, S.W. Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the non-collagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 618-22.

Gammon, W.R., Briggaman, R.A., Inman, A.O., Queen, L.L. und Wheeler, C.E. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 0.1M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol* 1984a; 82: 139-44

Gammon, W.R., Inman, A.O.d. und Wheeler, C.E., Jr. Differences in complement-dependent chemotacted activity generated by bullous pemphigoid und epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods. *J Invest Dermatol* 1984b; 83: 57-61.

Gammon, W.R., Yancey, K.B., Mangum, K.L., Hendrix, J.D. und Hammer, C.H. Generation of C5-dependent bioactivity by tissue-bound anti-BMZ autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 195-200.

Gandhi, K., Chen, M., Aasi, S., Lapiere, J.-C., Woodley, D. und Chan, L.C. Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype. *J Clin Immunol* 2000; 20: 416-23.

Giudice, G.J., Emery, D.J., and Diaz, L.A. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP 180. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 243-50.

Ghohestani, R.F., Hudson, B.G., Claudy, A., und Uitto, J. The alpha 5 chain of type IV collagen is the target of IgG autoantibodies in a novel autoimmune disease with subepidermal blisters and renal insufficiency. *J Biol Chem* 2000; 275: 16002-6.

Ghohestani, R.F., Nicolas, J.F., Rousselle, P., und Claudy, A.L. Identification of a 168kDa mucosal antigen in a subset of patients with cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 136-9.

Greenspan, D.S., Byers, M.G., Eddy, R.L., Hoffman, G.G., und Shows, T.B. Localization of the human collagen gene Col7A1 3p21.3 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 62: 35-36.

Hallel-Halevy, D., Nadelman, C., Chen, M. und Woodley, D.T. Epidermolysis bullosa acquisita: update and review. *Clin Dermatol* 2001; 19:712-18

Hanahan, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-80.

Hashimoto, T., Kiyokawa, C., Mori, O., Miyasato, M., Chidgey, M.A., Garrod, D.R., et al. Human desmocollin 1 (Dsc 1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 127-31.

Hausser, I., Fartasch, M., Schleiermacher, E., und Anton-Lamprecht, I. Disseminated cicatricial pemphigoid in a child and in an adult. Ultrastructural diagnostic criteria and differential diagnosis with spezial reference to acquired epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol Res* 1987; 279: 357-65.

Heinonen, S., Mannikko, M., Klement, J.F., Whitaker-Menezes, D., Murphy, G.F. und Uitto, J. Targeted inactivation of the type VII collagen gene (Col7a1) in mice results in a severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Cell Sci* 1999; 112: 3641-48.

Hovnanian, A., Rochat, A., Bodemer, C., Petit, E., Rivers, C.A., Prost, C., et al. Characterization of 18 new mutations in Col7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 599-610.

Karpati, S., Amagai, M., Prussick, R., Cehrs, K., und Stanley, J.R. Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 1993; 122: 409-15.

Keene, D.R., Sakai, L.Y., Lunstrum, G.P., Morris, N.P., und Burgeson, R.E. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1987; 104: 611-21.

Kirtschig, G., Marinkovich, M.P., Burgeson, R.E., und Yancey, K.B. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 543-8.

Korman, N., Eyre, R.W., Klaus-Kovtun, V., und Stanley, J.R. Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigen of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med* 1989; 321: 631-5.

Kumari, S., Bhol, K.C., Simmons, R.K., Razzaque, M.S., Letko, E., Foster, C.S., und Ahmed, A.R. Identification of ocular cicatricial pemphigoid antibody binding site(s) in human beta 4 integrin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42 : 379-85.

Lacour, J.P., Bernard, P., Rostain, G., Baechler-Sadoul, E., Pisani, A., und Ortonne, J.P. Childhood acquired epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol* 1995; 12: 16-20.

Laffitte, E., Favre, B., Fontao, L., Riou, S., Jaunin, F., Tamm, K., Saurat, J.H., und Borradori, L. Plectin, an unusual target antigen in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2001 ; 144 : 136-8.

Lapiere, J.C., Woodley, D.T., Parente, M.G., Iwasaki, T., Wynn, K.C., Christiano, A.M., und Uitto, J. Epitope mapping to type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 1993; 92: 1831-9.

Lazarova, Z., Yee, C., Darling, T., Briggaman, R.A., und Yancey, K.B. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J Clin Invest* 1996; 98:1509-18.

Leigh, I.M., Eady, R.A., Hargerty, A.H., Purkis, P.E., Whitehead, P.A., und Burgeson, R.E. Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 639-42.

Li, K., Christiano, A.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Chu, M.L., Jenkins, N.A., und Uitto, J. cDNA cloning and chromosomal mapping of the mouse type VII collagen gene (COL 7A1): evidence for rapid evolutionary divergence of the gene. *Genomics* 1993; 16:733-39.

Liu, Z., Diaz, L.A., Troy, J.L. et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP 180. *J Clin Invest* 1993; 92:2480-8.

McCuaig, C.C., Chan, L.S., Woodley, D.T., Rasmussen, J.E., und Cooper, K.D. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. Differentiation from hereditary epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 1989; 125: 944-9.

Memar, O., Christensen, B., Rajaraman, S., Goldblum, R., Tying, S.K., Brysk, M.M., McCormick, D.J., el-Zaim, H., Fan, J.L., und Prabhakar, B.S. Induction of blister-causing antibodies by a recombinant full-length, but not the extracellular, domain of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3). *J Immunol* 1996; 157: 3171-77.

Mooney, E., Falk, R.J., und Gammon, W.R. Studies on complement deposits in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1992; 128: 58-60.

Mooney, E. und Gammon, W.R. Heavy and light chain isotypes of immunoglobulin in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 317-9.

Morris, N.P., DR, K., Glanville, R.W., Bentz, H. und RE, W. The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J Biol Chem* 1986; 261: 5638-44.

Neubauer, P., Winter, J., Merten, O.-W., Mattanovich, D., Lang, C., Larsson, G., Porro, D., Postma, P.W., Teixeira de Mattos, J., und Cole, J. Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology. *Kluwer Acad Publishers* 2001; p 196

Nieboer, C., Boorsma, D.M., Woerdeman, M.J. , und Kalsbeck, G.L. Epidermolysis bullosa acquisita. Immunfluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br J Dermatol* 1980; 102: 383-92

Nguyen, V.T., Ndoeye, A., und Grando, S.A. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is target by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 2000a; 157: 1377-91.

Nguyen, V.T., Ndoeye, A., und Grando, S.A. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000b; 275: 29466-76.

Nousari, H.C., Rencic, A., Hsu, R., Yancey, K.B., und Anhalt, G.J. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with antibodies against the gamma2 subunit of laminin 5. *Arch Dermatol* 1999; 135: 173-6.

Parente, M.G., Chung, L.G., Ryyanen, J., Woodley, D.T., Wynn, K.C., Bauer, E.A., Mattei, M.G., Chu, M.L., und Uitto, J. Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6931-5.

Park, S.B, Cho, K.H., Youn, J.L., Hwang, D.H., Kim, S.C. und Chung, J.H. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood – a case mimicking chronic bullous dermatosis of childhood. *Clin Exp Dermatol* 1997; 22: 220-2.

Rose, N.R., und Bona, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14: 426-430.

Roenigk, H.H., Jr., Ryan, J.G., und Bergfeld, W.F. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 1971; 103.

Rudnicka, L., Varga, J., Christiano, A.M., Iozzo, R.V., Jimenez, S.A. und Uitto, J. Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sklerosis. Regulation by transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1994 ; 93 : 1709-15.

Rudolph, R., Cleland, J.L., und Craik, C.S. Principle and practice of protein folding. *Wiley*, New York

Sakai, L.Y., Keene, D.R., Morris, N.P. und R.E. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1986; 103: 1577-86.

Schmidt, E., Höpfner, B., Chen, M., Kuhn, C., Weber, L., Bruckner-Tuderman, L., Bröcker, E.-B., und Zillikens, D. Childhood epidermolysis bullosa acquisita: a novel

variant with reactivity to the three structural domains of type VII collagen. *Br J Dermatol* 2002

Shigemoto, T., Nashiro, K., Tsuchida, T., Seki, Y., und Tamaki, K. Administration of IgG fraction of epidermolysis bullosa acquisita (EBA) serum into mice. *J Dermatol* 1988; 15: 123-7 .

Shimanovich, J., Hirako, Y., Sitaru, C., Hashimoto, T., Bröcker, E.B., Butt, E., und Zillikens, D. The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1402-8.

Shimanovich, J., Mihai, S., Oostingh, G., Ilenchuk, T.T., Bröcker, E.B., Opdenakker, G., Zillikens D., und Sitaru, C. Granulocyte-derived elastase gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* 2004; 204: 519-27.

Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E.B., and Zillikens, D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent granulocyte activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol* 2002; 161: 301-11.

Sitaru, C., Goebeler, M., und Zillikens, D. Bullöse Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. *JDDG* 2004; 2: 123-139.

Sitaru, C., Powell, J., Messer, G., Bröcker, E.-B., Wojnarowska, F., und Zillikens, D. Immunoblotting and enzyme – linked immunosorbent assay for the diagnosis of the pemphigoid gestationes. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 757-763.

Smith, L.T. und Sybert, V.P. Intra-epidermal retention of type VII collagen in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1990; 94:261-4.

Stanley, J.R., Rubinstein, N. und Katz, S.I. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982; 70: 281-8.

Stanley, J.R., Hawley-Nelson, P., Yuspa, S.H., Shevach, E.M., und Katz, S.I. Characterisation of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24: 897-903.

Stanley, J.R., Rubinstein, N, und Klaus-Kovtun, V. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is synthesized by both human keratinocytes and human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1985; 85: 542-5.

Stewart, M.I., Woodley, D.T., und Briggaman, R.A. Epidermolysis bullosa acquisita and associated symptomatic oesophageal webs. *Arch Dermatol* 1991; 127: 373-7.

Swartz, J.R., Neidhart, F.C., Curtis, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. *ASM Press* 1996; 1693

Tanaka, T., Furukawa, F., und Imamura, S. Epitope mapping for epidermolysis bullosa acquisita autoantibody by molecularly cloned cDNA for type VII collagen. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 706-9.

Tanaka, H., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, T., Hiramoto, K., Harada, T., Kawachi, Y., et al. A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen. *Lab Invest* 1997; 77:623-32.

Tyagi, S., Bhol, K., Natajara, K., Livir-Rallatos, C., Foster, C.S., und Ahmed, A.R. Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14714-9.

Wang, J., Kwon, J., Ding, X., Fairley, J.A., Woodley, D.T., und Chan, L.S. Nonsecretory IgA1 autoantibodies targeting desmosomal component desmoglein 3 in intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis. *Am J Pathol* 1997 ; 150: 1901-7.

Woodley, D.T., Briggaman, R.A., O'Keefe, E.J., Inman, A.O., Queen, L.L., and Gammon, W.R. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 1984; 310: 1007-13.

Woodley, D.T., Burgeson, R.A., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M.J., und Briggaman, R.A. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest* 1988; 81: 683-7.

Woodley, D.T., O'Keefe, E.J., McDonald, A.J., Reese, M.J., Briggaman, R.A., und Gammon, W.R. Specific affinity between fibronectin and the epidermolysis bullosa acquisita antigen. *J Clin Invest* 1987; 79 : 1826-30.

Yaoita, H., Briggaman, R.A., Lawley, T.J., Provost, T.T. und Katz, S. I. Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 288-92.

Yuspa, S.H., Hawley-Nelson, P., Stanley, J.R., und Hennings, H. Epidermal cell culture. *Transplant Proc* 1980; 12:114-22.

Zhu, X.J, Niimi, Y., und Bystry, J.C. Epidermolysis bullosa acquisita. Incidence in patients with basement membrane zone antibodies. *Arch Dermatol* 1990 ; 126 : 171-4

Zillikens, D., Kawahara, Y., Ishiko, A., Shimizu, H., Mayer, J., Rank, C.V., et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 1996 ; 106 : 133-8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens und meinem Betreuer Dr. med. Cassian Sitaru für die Überlassung des Themas, die wertvollen fachlichen Anregungen und die ständige Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Professor Dr. med. E.-B. Bröcker, Direktorin der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg.

Mein persönlicher Dank gilt

Dipl.-Wirtschaftsinform. Michael Schuster für die umfangreiche und kompetente EDV-Beratung und die ansteckend humorvolle Betrachtung sämtlicher aufgetretener Probleme

meinen lieben Eltern

sowie meiner Großmutter, die während des Studiums und meiner Tätigkeit im Labor stets mitfieberten und meine vermutlich größten Fans sind.

Lebenslauf

Barbara Ruth Dotterweich
Trierer Strasse 37
56072 Koblenz

Tel.: 0261-5797684
Email: barb.dotterweich@gmx.de

- Geburtsdatum:** 19. Februar 1977 in Illertissen
- Familienstand:** ledig
- Beruf:** Assistenzärztin Neurochirurgie Koblenz
Approbation seit dem 11. November 2004
- Prüfungen:** Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 5. November 2004
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 19. September 2003
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 19. September 2002
Physikum 19. September 2000
- Studium:** WS 2000 bis SS 2004 Humanmedizin an der Universität
Würzburg
WS 1998 bis SS 2000 Humanmedizin an der Universität
Regensburg
- Famulaturen:** Neurologie
Neurochirurgie
Allgemeinmedizin
Dermatologie
- Schule:** Erlangung der allgemeinen Hochschulreife an der Hohen
Landesschule Hanau am 23. Juni 1997

Veröffentlichung

Sitaru C., Mihai S., Otto C., Chiriac M.T., Hausser I., Dotterweich B., Saito H., Rose C., Ishiako A. und Zillikens D. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest.* 2005 Apr; 115(4):870-8